

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor Prof. Dr. med. C. Röcken),  
Sektion für Hämatopathologie  
(Leiter Prof. Dr. med. W. Klapper)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Expressionsmuster von FLI1, DKK1, INPP5D und BCL9 in der solid pseudopapillären  
Neoplasie, dem duktalem Adenokarzinom sowie der intraduktal papillär-muzinösen  
Neoplasie des Pankreas  
und deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**Julia Philipp**  
aus **Berlin**

Kiel **2018**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Klapper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Trauzold

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.05.2019

gez.: Prof. Dr. J. Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsangabe

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Diagramme	V
1. Einleitung	1
1.1. Solid pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas	1
1.1.1. Makroskopie	1
1.1.2. Histologie und Immunhistochemie	2
1.1.3. Molekulargenetische Besonderheiten	2
1.2. Duktales Adenokarzinom des Pankreas	3
1.2.1. Tumorausbreitung	3
1.2.2. Makroskopie	4
1.2.3. Histopathologie und Immunhistochemie	4
1.2.4. genetische Besonderheiten	5
1.3. Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie des Pankreas	5
1.3.1. Makroskopie	6
1.3.2. Histopathologie und Immunhistochemie	6
1.3.3. Genetik	7
1.4. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg	7
1.5. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der Malignomentstehung	9
1.5.1. Zusammenhang zwischen SPN und Wnt-Signalweg	9
1.5.2. Zusammenhang zwischen PDAC und Wnt-Signalweg	10
1.5.3. Zusammenhang zwischen IPMN und Wnt-Signalweg	10
1.6. FLI1	11
1.6.1. FLI1 und SPN	11
1.7. DKK1	12
1.7.1. DKK1 und SPN	13
1.7.2. DKK1 und PDAC	13
1.8. INPP5D (SHIP1)	13
1.8.1. INPP5D und SPN	15
1.8.2. INPP5D und PDAC	15
1.9. BCL9	15
2. Fragestellung	17
3. Material und Methoden	18
3.1. Patienten	18
3.2. Labortechnischer Teil	18
3.2.1. Material	18
3.2.1.1. Chemikalien/Sonstiges	18
3.2.1.2. Verbrauchsmaterialien	19
3.2.1.3. Primer	20
3.2.1.4. Sonden	20
3.2.1.5. Komplett-Systeme (Testkits)	20
3.2.1.7. Software	21
3.2.2. Probenvorbereitung	21
3.2.2.1. manuelle Mikrodisektion der Gewebeproben	21
3.2.3. Entparaffinierung	22
3.2.4. RNA-Extraktion	22
3.2.5. Qualitative RNA-Kontrolle	23
3.2.5.1. Primer-Design und -Kontrolle	24
3.2.5.2. Ansatz und Durchführung der qualitativen RT-PCR	24
3.2.5.3. Integritätskontrolle der Tumorgewebe	25
3.2.6. Herstellung der Referenzprobe aus Normalgewebe	26
3.2.7. Quantitative Echtzeit-PCR	26
3.2.7.1. Funktionsprinzip der quantitativen TaqMan-PCR	27
3.2.7.2. Sonden-Kontrolle	28
3.2.7.3. Ansatz und Durchführung der TaqMan-PCR	28
3.2.8. Quantifizierung	31
3.2.8.1 Ct-Wert	31
3.2.8.2. Relative (= vergleichende) Quantifizierung	31
3.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse	32
3.3.1. Vergleich der Expressionsmuster in den verschiedenen Tumorentitäten	33

3.3.2. Korrelation der Genexpressionen innerhalb einer Tumorentität	33
4. Ergebnisse	34
4.1. Patientendaten	34
4.1.1. SPN	34
4.1.2. PDAC	34
4.1.3. IPMN	34
4.2. Quantitative Analyse	35
4.2.1. FLI1	36
4.2.1.1. SPN	37
4.2.1.2. PDAC	38
4.2.1.3. IPMN	39
4.2.1.4. Statistische Auswertung der FLI1-Expressionen	40
4.2.2. DKK1	41
4.2.2.1. SPN	42
4.2.2.2. PDAC	43
4.2.2.3. IPMN	43
4.2.2.4. Statistische Auswertung der DKK1-Expressionen	44
4.2.3. INPP5D	45
4.2.3.1. SPN	46
4.2.3.2. PDAC	46
4.2.3.3. IPMN	47
4.2.3.4. Statistische Auswertung der INPP5D-Expressionen	48
4.2.4. BCL9	50
4.2.4.1. SPN	51
4.2.4.2. PDAC	51
4.2.4.3. IPMN	52
4.2.4.4. Statistische Auswertung der BCL9-Expressionen	53
4.3. Vergleich der Expressionsmuster in den verschiedenen Tumorentitäten	55
4.3.1. SPN vs. PDAC	55
4.3.2. SPN vs. IPMN	55
4.3.3. PDAC vs. IPMN	55
4.4. Korrelation der Genexpressionen innerhalb einer Tumorentität	56
4.4.1. SPN	56
4.4.2. PDAC	58
4.4.3. IPMN	60
5. Diskussion	62
5.1. FLI1-RNA-Expressionsanalyse	63
5.2. DKK1-RNA-Expressionsanalyse	64
5.3. INPP5D-RNA-Expressionsanalyse	65
5.4. BCL9-RNA-Expressionsanalyse	67
6. Zusammenfassung	68
7. Literaturverzeichnis	VII
8. Abgrenzung der Doktorarbeit von der Diplomarbeit	XI
Danksagung	XII
Zustimmung	XIII

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous polyposis coli
AU	artificial units
BCL9	B-cell lymphoma 9
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ct	Cycle Threshold (=Schwellenwert-Zyklus)
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1
DKK1	Dickkopf1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	epitheliales Membranantigen
EWS	Ewing Sarcoma
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FLI1	Friend leukemia virus integration 1
F-MuLV	Friend murine leukemia virus
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
Fz-Rezeptor	Frizzled-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GNAS	Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
INPP5D	inositol polyphosphate-5-phosphatase
IPMN	intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
MUC	Muzin
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher
PCR	Polymerase Chain Reaction (=Polymerase-Kettenreaktion)
PDAC	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
qRT-PCR	real-time quantitative PCR (=quantitative Echtzeit-PCR)
RT	Reverse Transkription

SHIP1	Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol-5-phosphatase-1
SPN	solid pseudopapilläre Neoplasie
STEP	Single Target Expression Profiling
TCF	T-cell-specific-transcription-factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless and INT1

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: verwendete Primer

Tab. 2: Durchführung der RNA-Extraktion

Tab. 3: verwendete Sonden

Tab. 4: Genexpressionen von FLI1 im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1)

Tab. 5: Genexpressionen von DKK1 im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1)

Tab. 6: Genexpressionen von INPP5D im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1)

Tab. 7: Genexpressionen von BCL9 im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1)

Tab. 8: Korrelation zwischen 2 Genen in der SPN mit dem entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizient r

Tab. 9: Korrelation zwischen 2 Genen im PDAC mit den entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizienten r

Tab. 10: Korrelation zwischen 2 Genen in der IPMN mit den entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizienten r

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Abb. 2: Modell der negativen Feedback-Schleife von FLI1 und INPP5D in einer normalen Zelle (a) sowie einer Tumorzelle (Leukämiezelle) (b)

Abb. 3: Funktionsprinzip der TaqMan-Reagenzien

Abb. 4: Thermoprofil der qRT-PCR (StepOne)

## Diagramme

Diagramm 1: relative FLI1-Genexpressionen in der SPN

Diagramm 2: relative FLI1-Genexpressionen im PDAC

Diagramm 3: relative FLI1-Genexpressionen in der IPMN

Diagramm 4: FLI1-Expressionen in der SPN, PDAC und IPMN

Diagramm 5: relative DKK1-Expression in der SPN

Diagramm 6: relative DKK1-Genexpressionen im PDAC

Diagramm 7: relative DKK1-Genexpressionen in der IPMN

Diagramm 8: relative INPP5D-Genexpressionen in der SPN

Diagramm 9: relative INPP5D-Genexpressionen im PDAC

Diagramm 10: relative INPP5D-Genexpressionen in der IPMN

Diagramm 11: INPP5D-Expressionen in der SPN, PDAC und IPMN

Diagramm 12: relative BCL9-Genexpressionen in der SPN

Diagramm 13: relative BCL9-Genexpressionen im PDAC

Diagramm 14: relative BCL9-Genexpressionen in der IPMN

Diagramm 15: BCL9-Expressionen in der SPN, PDAC und IPMN

Diagramm 16: graphische Darstellung der Korrelation zwischen zwei Genen in der SPN (logarithmische Werte)

Diagramm 17: graphische Darstellung der Korrelation zwischen zwei Genen im PDAC  
(logarithmische Werte)

Diagramm 18: graphische Darstellung der Korrelation zwischen zwei Genen in der  
IPMN (logarithmische Werte)



# **1. Einleitung**

## **1.1. Solid pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas**

(engl.: solid-pseudopapillary tumor; SPT)

Die solid pseudopapilläre Neoplasie (im folgenden kurz SPN) des Pankreas stellt mit einem Anteil von 0,9-2,7% aller exokrinen pankreatischen Neoplasien eine Gruppe seltener Tumoren dar (1). Sie besitzen eine hervorragende Prognose und betreffen in 90% der Fälle junge Frauen (Durchschnittsalter: 28 Jahre) (1). Bei unter 40-jährigen Patienten machen sie sogar 30% der pankreatischen Neoplasien aus (1).

Da sie mit nur unspezifischen abdominellen Beschwerden (Übelkeit, Schmerzen, Unbehagen, Erbrechen) einhergehen oder häufig sogar asymptomatisch sind, werden die SPN meist zufällig diagnostiziert (2). In den allermeisten Fällen lassen sich weder erhöhte Pankreasenzyme aufgrund einer Pankreasinsuffizienz noch ein endokrines Syndrom, Cholestase, Ikterus oder abnormale Leberfunktionstests finden (2). Aufgrund der niedrigen proliferativen Aktivität und ihres geringen Malignitätspotentials von 5-10% ist die Prognose nach einer kompletten chirurgischen Tumoresektion mit einer 85-95%-igen Heilungschance exzellent, sogar bei bereits nachgewiesenen Metastasen (2).

Obwohl einige wenige Fälle bereits im Rahmen einer hereditären familiären adenomatösen Polyposis (kurz FAP) nachgewiesen werden konnten, besteht keine ethnische Prädisposition oder Assoziation mit klinischen oder genetischen Syndromen (1).

Wie bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit näher ausgeführt, besitzt die SPN des Pankreas charakteristische morphologische und biologische Besonderheiten, jedoch einen unklaren zellulären Ursprung (3).

### **1.1.1. Makroskopie**

Pankreas-SPNs sind runde, glatt begrenzte Tumoren, deren Schnittfläche typischerweise eine fibröse (Pseudo-) Kapsel mit randständig solidem Gewebe sowie eine zentrale pseudozystische Degeneration durch blutgefüllte Hohlräume hämorrhagischer Nekrosen zeigt

(1). Die Zusammensetzung der jeweiligen Bestandteile ist sehr variabel, jedoch besitzen größere Tumoren tendenziell weniger solide Anteile als kleinere Exemplare (1). Mit einer durchschnittlichen Größe von 8-10 cm können SPNs in jeder Pankreasregion und selten auch extrapankreatisch (z.B. im Mesokolon oder retropankreatischen Gewebe) auftreten (1). Nur selten kommt es zu einer direkten Ausbreitung der SPNs in angrenzende Organe wie Milz, Magen oder Duodenum (1). In 5-15% der Fälle lassen sich Metastasen nachweisen, welche sich meistens in regionalen Lymphknoten, dem Peritoneum oder der Leber befinden (1).

### **1.1.2. Histologie und Immunhistochemie**

Kennzeichnend für Pankreas-SPNs sind ihre weitgehend monomorphen histologischen Eigenschaften (4). Sie weisen wenig Atypien auf, Mitosen kommen nur äußerst selten vor und die einheitlich geformten Nuklei zeigen selten sichtbare Nukleoli (4). Ihr pseudopapilläres Muster entsteht durch die nur locker kohäsive Verbindung der Tumorzellen untereinander (1). Alle Gewebelemente liegen dabei locker in einem myxoiden oder hyalinisierten Stroma verankert (5). Extrem selten kommt es zu einer Angioinvasion oder einem perineuralen Wachstum (5). Im Gegensatz zu den eindeutig beschriebenen biologischen und histologischen Merkmalen, ist die zelluläre Herkunft der SPNs und ihre phänotypische Beziehung zum Pankreas noch immer nicht vollständig geklärt (3). Eine Reihe immunhistochemischer Marker sind jedoch häufig exprimiert (3). Hierzu zählen vor allem die neuroendokrinen Marker CD56 (=NCAM), CD10, Neuronen-spezifische Enolase (kurz NSE) und Progesteron-Rezeptor sowie das Protein Vimentin als Marker für mesenchymales Gewebe (3). SPNs weisen in 98% der Fälle ein aberrantes immunhistochemisches Expressionsmuster von  $\beta$ -Catenin, gefolgt von einer erhöhten Cyclin D1-Expression, auf (69% der Fälle) (4).

### **1.1.3. Molekulargenetische Besonderheiten**

83-90% der SPNs zeigen eine Aktivierung des Wingless and INT1 (im folgenden kurz Wnt)-Signalweges aufgrund einer  $\beta$ -Catenin-Mutation in Exon 3 des CTNNB1-Gens (1-bp missense-Mutation in den Codons 32-34, 37 oder 41 (7)), was in 70-100% der SPNs zu einer

Überexpression von Cyclin D1, einem Zellzyklus-assoziierten Protein und primären Ziel des Wnt-Signalwegs, führt (4). Jedoch resultiert diese Cyclin D1-Überexpression nicht, wie in vielen anderen Neoplasien üblich, in einer erhöhten Proliferationsrate, sondern zeigt in SPNs keinen, bzw. nur einen geringen Wachstumseffekt (4).

## **1.2. Duktales Adenokarzinom des Pankreas**

Das pankreatische duktale Adenokarzinom (im folgenden kurz PDAC) ist eine maligne epitheliale Neoplasie des Pankreas mit glandulärer (duktales) Differenzierung (8), welches mit 85-90% die häufigste pankreatische Neoplasie darstellt (9). Aufgrund der sehr geringen 5-Jahres-Überlebensraten von unter 5 % (10) ist es die fünfthäufigste Krebs-Todesursache in den westlichen Ländern und sogar die zweithäufigste des Verdauungstraktes (9). Die mittlere Überlebenszeit eines unbehandelten Patienten beträgt 3 Monate, die eines Patienten nach radikaler R0-Whipple-Resektion variiert zwischen 10 und 20 Monaten (9). In ca. 80% der Fälle manifestiert sich das PDAC klinisch zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (9).

Aufgrund des charakteristischen Zytokeratin-Expressionsusters und den phänotypischen Ähnlichkeiten entsteht das muzin-produzierende PDAC vermutlich aus dem pankreatischen Gangepithel (9).

### **1.2.1. Tumorausbreitung**

60-70% der PDAC befinden sich im Pankreaskopf, vor allem in dessen oberer Hälfte (9). Die Übrigen sind im Pankreaskörper oder -schwanz lokalisiert (9). Da es hierbei zu einer Zerstörung der Langerhans-Inseln kommt, entwickeln ca. 70% der Patienten einen Diabetes mellitus (9).

In den allermeisten Fällen haben sich die PDAC bereits über das Pankreas hinaus ausgebreitet, oft über perineurale Scheiden primär in das retroperitoneale Fettgewebe, Venen und Nerven sowie Lymphknoten (9). In fortgeschrittenen Karzinomen kann es jedoch auch

zum direkten Befall benachbarter Organe oder des Peritoneums kommen (9). Die hämatogene Metastasierung findet vor allem in die Leber, Lunge, (Neben-) Nieren, Knochen, Gehirn und Haut statt (9).

### **1.2.2. Makroskopie**

PDAC sind unregelmäßig begrenzte feste Tumoren, deren Schnittfläche weißlich bis gelb erscheint (9). Hämorrhagien und zentrale Nekrosen sind ungewöhnlich, mikrozystische Gebiete können jedoch vorkommen (9). Die Größe der meisten Kopfkarcinome liegt bei durchschnittlich 2,5 bis 3,5 cm, die vom Körper und Pankreasschwanz sind bei Diagnosestellung meist etwas größer (9). Tumoren im Kopfbereich infiltrieren und stenosieren häufig den Ductus choledochus oder Ductus pancreaticus (9). Dies resultiert in einer proximalen Dilatation des Ganges und führt je nach Lokalisation zu einer chronisch-obstruktiven Pankreatitis oder (bei Einbeziehung der Papilla Vateri bzw. der Duodenalwand) zu Ulzerationen (9).

### **1.2.3. Histopathologie und Immunhistochemie**

Die meisten PDAC sind gut bis mäßig differenzierte Tumore mit glandulären Strukturen, welche die normalen Pankreasgänge imitieren (9). Verschiedene Differenzierungsgrade innerhalb einer Neoplasie kommen häufig vor (9). Ihre charakteristischen muzinproduzierenden neoplastischen Zellen sind meistens säulenförmig angeordnet, haben ein eosinophiles Zytoplasma und sind größer als Zellen von normalen Pankreasgängen (9). Der Verlust der Tumor-Differenzierung zeichnet sich u.a. durch das Verschwinden der Zell-Polarität sowie den Verlust der Muzingranula und somit -produktion aus, was in einem aggressiverem Verhalten der Tumoren resultiert (9).

Obwohl es keinen charakteristischen (immun-) histochemischen Marker gibt, sind doch einige Marker hilfreich, um duktale Adenokarzinome des Pankreas von nicht-duktalen oder anderen gastrointestinalen Karzinomen zu unterscheiden (9). So exprimieren die meisten PDAC das Mucin MUC1 (87% (11)) und die CK7 (92% (12)), sind jedoch für MUC2 und CK20 (als spezifischen Marker für gastrointestinale Tumoren) negativ. Zudem zeigen PDAC eine höhere

Expression des CEA (carcinoembryonic antigen) sowie des S100P (S100 calcium-binding protein P) (13).

#### **1.2.4. genetische Besonderheiten**

Über 90% der invasiven pankreatischen dukталen Adenokarzinome weisen genetische Veränderungen des KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog im folgenden kurz KRAS)-Signalweges auf, wobei diese schon in frühen Stadien der Karzinomentstehung (z.T. bereits in der Vorläuferläsion PanIN) auftreten (14). Die häufigste Mutation ist dabei eine gain-of-function Punkt-Mutation des Codon 12, wodurch KRAS konstitutiv aktiviert wird (14). Dies führt zu Zellwachstum und Proliferation unabhängig von vorgeschalteten Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie z.B. des Epidermal Growth Factor Receptor (im folgenden kurz EGFR) (14). Zudem scheint die Mutation des KRAS mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher zu gehen (15).

### **1.3. Intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie des Pankreas**

Die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie (im folgenden kurz IPMN) des Pankreas ist durch eine intraduktale Proliferation von neoplastischen muzinproduzierenden Zellen gekennzeichnet, welche durch Papillenbildung zu einer zystischen Dilatation des Pankreasganges führt (16).

Die IPMN entspringt dem Pankreas-Hauptgang oder seinen größeren Zweigen, wobei die Komponente des papillären Epithels, die Dilatation des Ductus cysticus, der Grad der Muzin-Sekretion sowie die Invasivität variable Eigenschaften darstellen (8).

IPMNs machen mit einer Inzidenzrate deutlich unter 1/100.000/Jahr schätzungsweise 1-3% der exokrinen Pankreasneoplasien aus (8). Sie betreffen öfter Männer als Frauen und kommen, mit einem Durchschnittsalter von 60 – 70 Jahren bei Diagnosestellung, in fast jedem Alter vor (30-94 J.) (8). Klinisch treten sie entweder durch Gewichtsverlust, epigastrischen Schmerz, Pankreatitis, Diabetes mellitus oder Ikterus in Erscheinung oder sind

völlig asymptomatisch (8). Die Serum-Amylase und -Lipase sind für gewöhnlich erhöht (8). IPMNs können, je nach dem größten vorkommenden Dysplasiegrad, in benigne (intraduktales papillär-muzinöses Adenom), borderline (borderline intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie) und maligne Läsionen (intraduktal papillär-muzinöses Karzinom mit oder ohne Invasion) eingeteilt werden (9). Dabei ist eine Progression von IPMN-Adenomen über Borderline-Tumore mit Dysplasie bis hin zu IPMNs mit einem Carcinoma in situ möglich (17). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für alle Stadien zusammen 83%, wobei die Prognose für Adenome und Borderline-Tumore mit einer 3- und 5-Jahres-Überlebensrate von annähernd 100% exzellent ist (9).

### **1.3.1. Makroskopie**

Abhängig von dem Ausmaß der Gangdilatation variieren IPMNs in ihrer Größe von 1 bis maximal 8 cm (9). Sie sind zystisch und können bei Beteiligung weiterer Äste multilokulär vorkommen (9). Ihr Muzin ist viskös und kann Teile des Ganges dilatieren (Hauptgang oder größere Abzweigungen), welcher von normal erscheinendem Epithel ausgekleidet ist (9). Das den Tumor umgebene Pankreas-Parenchym ist oft blass und fest, was die Veränderungen einer chronisch-obstruktiven Pankreatitis widerspiegelt (9).

### **1.3.2. Histopathologie und Immunhistochemie**

IPMN-Tumorzellen sind häufig große säulenförmige Epithelzellen, welche Muzin enthalten und dilatierte Gänge oder zystische Räume auskleiden (9). Das Epithel bildet dabei typischerweise papilläre oder pseudopapilläre Strukturen, jedoch können Anteile der Neoplasie von nicht-papillärem Epithel ausgekleidet sein (9). Aufgrund der unterschiedlichen Histologie dieser muzin-enthaltenden neoplastischen Zellen wird die IPMN in 4 Subgruppen unterteilt: gastrisch, intestinal, pankreatobiliär und onkozytisch (18). So besteht die gastrische IPMN aus großen gutartigen Zellen, welche dem Epithel der Magenschleimhaut ähneln und vor allem Muzin (im folgenden kurz MUC) 5AC exprimieren, jedoch negativ für MUC 1 und 2 sind (18). Die Zellen der intestinalen IPMN ähneln denen einer intestinalen villösen Neoplasie mit einer Expression von MUC2 und MUC5AC, jedoch nicht von MUC1 (18).

Pankreatobiliär-ähnliche IPMN bestehen hingegen aus dünnen, verzweigten Papillen mit high-grade Dysplasie, sind negativ für MUC2 und höchstens fokal-positiv für MUC1 und MUC5AC (18). Die Gruppe der onkozytischen IPMN besitzt komplexe, sich verzweigende Papillae, welche von Kuboidzellen mit granulärem eosinophilen Zytoplasma umgeben sind und häufig MUC5A und MUC6 exprimieren, jedoch MUC2-negativ sind (18).

Die meisten IPMNs exprimieren zusätzlich das epitheliale Membranantigen (kurz EMA) sowie das Zytokeratin CK7 (9).

### **1.3.3. Genetik**

41% (19) - 79% (20) der IPMN weisen aktivierende Mutationen des GNAS-Genes auf (Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating im folgenden kurz GNAS), wobei die meisten von ihnen Codon 201 betreffen. KRAS ist, je nach histologischem Subtyp, in 40% (intestinal) bis 93% (gastrisch) der IPMN mutiert, wobei diese Mutation vor allem Codon 12 betrifft (20). Ein Viertel (25 %) aller Tumore wies sogar beide dieser somatischen Mutationen auf (19). Das eine Ubiquitin-Ligase kodierende Gen RNF43 ist am dritthäufigsten in IPMNs mutiert und tritt immer nur im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen GNAS- und/oder KRAS-Mutation auf (19, 20). Nur high-grade IPMN zeigen zusätzliche Mutationen im TP53- und BRAF-Gen (10% und 6%) (20).

## **1.4. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg**

Das intrazelluläre  $\beta$ -Catenin wird normalerweise durch den Wnt-Signalweg reguliert (21). Die Wnt-Wachstumsfaktoren sind in nahezu jedem Aspekt der Embryogenese involviert und kontrollieren zudem die homeostatische Selbsterneuerung einer Vielzahl von Geweben, weshalb sie eine wichtige Rolle in der Entstehung bestimmter Krebsformen (s.u.) spielen (21).

In folgender Abbildung ist der  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalweg in seiner inaktiven sowie aktiven Form dargestellt:

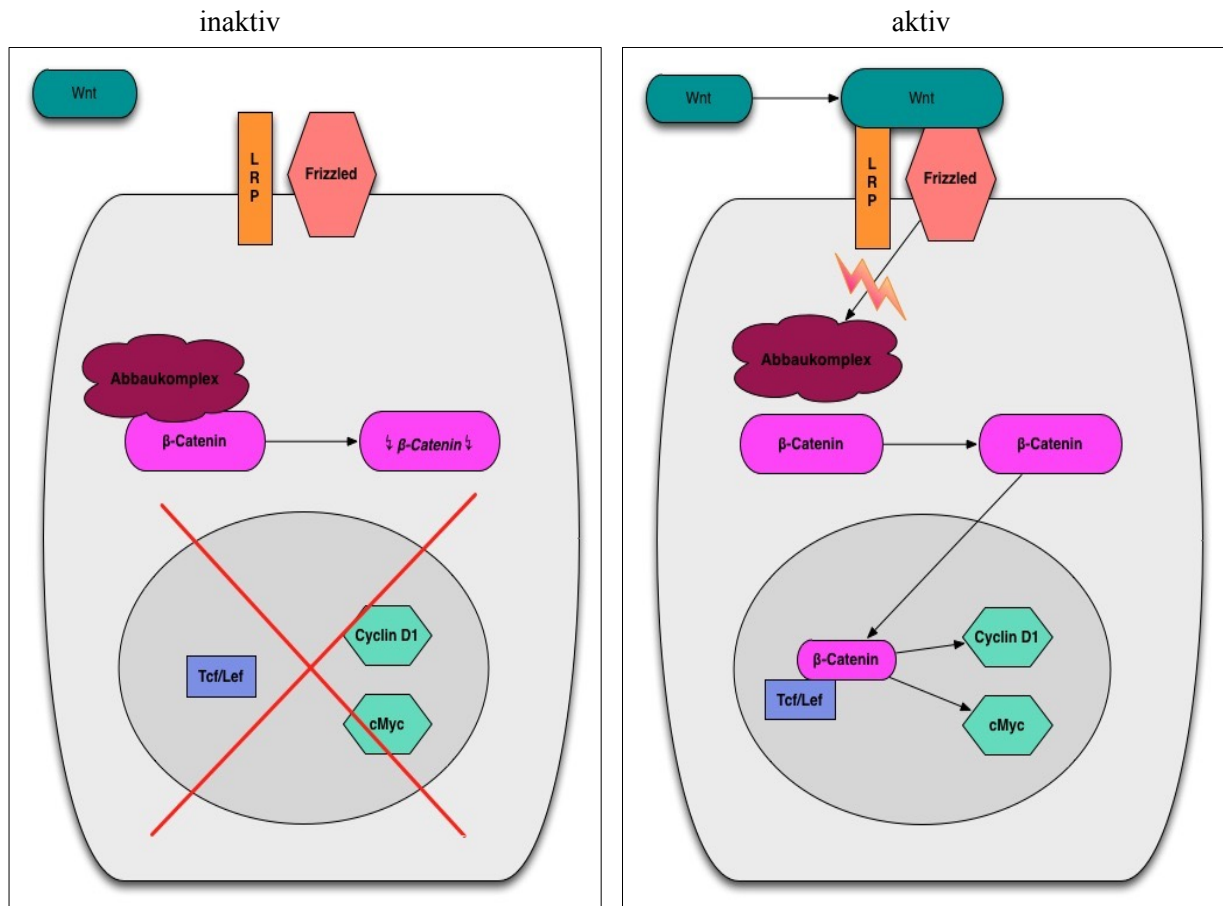


Abb.1: Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (nach (6))

Sind Zellen den Wnt-Proteinen nicht ausgesetzt, verbindet sich zytoplasmatisches  $\beta$ -Catenin mit einem Abbaukomplex, welcher dessen Degradation bewirkt (21). So wird die Transkription der Wnt-Zielgene durch den nukleären T-cell-specific-transcription-factor (im folgenden kurz TCF) unterdrückt (21).

Binden jedoch Wnt-Proteine an den Frizzled- (im folgenden kurz Fz) Rezeptor und seinen Co-Rezeptor low density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (im folgenden kurz LRP5/6), wird diese Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes inhibiert (22). Folglich kommt es zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma, welches anschließend in den Zellkern transloziert und dort an den TCF bindet (23). Dadurch induziert es die Expression von



entsprechenden TCF-Zielgenen (z.B. das potenziell onkogene Cyclin D1 oder cMyc), welche die Proliferation, Migration und das Überleben der Zelle regulieren (22).

### **1.5. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in der Malignomentstehung**

Während in der Embryogenese und bei der homeostatischen Selbsterneuerung vieler Gewebe die Aktivität des Wnt-Signalweges streng reguliert ist, kann er in der Krebsentstehung oder anderen Krankheiten dieser Kontrolle entkommen (24).

Durch eine Vielzahl von loss-of-function Mutationen in den Abbaukomplexbestandteilen Axin und Adenomatous polyposis coli (im folgenden kurz APC) sowie durch eigene aktivierende Mutationen kann  $\beta$ -Catenin der zytoplasmatischen Destruktion entkommen, im Zellkern persistieren und so zu einer onkogenen Transkription der Zielgene führen (22).

Eine Keimbahnmutation des Tumorsuppressorgens APC führt beispielsweise zur hereditären Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP), eine somatische Mutation desselben Gens zu sporadischen kolorektalen Karzinomen (24). Ebenso wurde eine gain-of-function Mutation des  $\beta$ -Catenin-Gens catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (im folgenden kurz CTNNB1) bereits in verschiedenen Malignomen nachgewiesen, z.B. bei Kolon-Karzinomen und anderen gastrointestinalen Tumoren, Melanomen, hepatozellulären Karzinomen, Hepatoblastomen, Medulloblastomen oder Wilms-Tumoren (24).

#### **1.5.1. Zusammenhang zwischen SPN und Wnt-Signalweg**

83-90% der SPN zeigen eine Aktivierung des Wnt-Signalweges aufgrund einer  $\beta$ -Catenin-Mutation in Exon 3 des CTNNB1-Gens, durch welche die intrazytoplasmatische Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und somit die Degradation des Proteins verhindert wird (4). Das so stabilisierte Protein transloziert in den Zellkern, wo es für die Regulierung von Aktivatoren des Zellzyklus, vor allem des potenziell onkogenen Cyclin D1, verantwortlich ist (4).

Obwohl fast alle SPN (70-100%) solch eine Überexpression von Cyclin D1 aufweisen, sind diese Tumoren in ihrem klinischen Verhalten erstaunlich benigne (4). Der

molekulargenetische Grund, warum diese Überexpression eines Zellzyklus-assoziierten Proteins nicht, wie in vielen anderen Neoplasien üblich (4), zu einer erhöhten Proliferationsrate führt, sondern nur mit einem moderaten Wachstum einhergeht, stellt noch immer eine ungelöste Frage dar (6). Eine mögliche Erklärung für diese geringe proliferative Aktivität stellt die Protein-Expression von p21 und p27 in 86%, bzw. 100% der SPN dar, denn diese Inhibitoren der Cyclin dependent Kinasen regulieren als Gegenspieler von Cyclin D1 die Proliferationsaktivität der Zelle herunter (4).

### **1.5.2. Zusammenhang zwischen PDAC und Wnt-Signalweg**

Im Gegensatz zur SPN kommen Mutationen des  $\beta$ -Catenin-Gens CTNNB1 oder der Abbaukomplexbestandteile Axin und APC im PDAC nur selten vor (25). In der Mehrheit der PDAC-Tumorproben weist  $\beta$ -Catenin, welches sich im normalen pankreatischen Gewebe ausschließlich in der Zellmembran befindet, eine aberrante zytoplasmatische (65%) und nukleäre (13%) Expression auf und deutet somit auf einen aktivierten Wnt-Signalweg hin (26). Jedoch bleibt sowohl der genaue Ursprung als auch die biologische und klinische Bedeutung dieser Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivierung bei Patienten mit PDAC Tumoren unklar (25).

Desweiteren zeigen PDAC, verglichen zum normalen Pankreasgewebe, eine gesteigerte Expression verschiedener Wnt-Liganden (Fz-Rezeptor, Wnt sowie verschiedene Inhibitoren des Wnt-Signalweges wie DKK1 (26)), welche möglicherweise auf eine autokrine Aktivierung des Pathways hindeuten (27).

### **1.5.3. Zusammenhang zwischen IPMN und Wnt-Signalweg**

Im Gegensatz zu den oben genannten Neoplasien, ist die Rolle des Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in der IPMN umstrittener und weniger gut erforscht (18). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben eine abnormale nukleäre  $\beta$ -Catenin Lokalisation in 39% der IPMN, wobei mehr als die Hälfte von ihnen ebenfalls eine fehlende Expression des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexbestandteils APC aufwiesen (28). Dabei konnte vor allem in höhergradigen IPMN (Carcinoma in situ oder invasives Karzinom) nukleäres  $\beta$ -Catenin gefunden werden (28). 78% der Tumorproben zeigten eine diffuse Hochregulierung des c-Myc Proteins, 67%

der Fälle eine Überexpression des Cyclin D1-Proteins (28). Diese Resultate deuten darauf hin, dass auch ein Teil der IPMN Abweichungen im Wnt-Signalweg mit der daraus folgenden veränderten Expression von nachgeschalteten Proteinen aufweisen (28).

## **1.6. FLI1**

Das Mitglied der E-twenty-six (kurz ETS)-Transkriptionsfaktor-Familie Friend leukemia virus integration 1 (im folgenden kurz FLI1) spielt als Transkriptionsfaktor und Protoonkogen eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese, der normalen Entwicklung von Geweben und der Onkogenese (29). FLI1, dessen Gen sich auf Chromosom 11q23-24 befindet (29), wird in endothelialen Zellen und hämatopoetischen Geweben stark exprimiert, sowie mäßig in Herz, Lunge und Ovarien (19). Diese ubiquitäre Expression in allen endothelialen Zellen sowie die Tatsache, dass FLI1 als früher Marker der endothelialen Differenzierung einen wichtiger Faktor in der Embryogenese und dem Gefäßwachstum darstellt, lässt auf seine Bedeutung als vaskulären Marker und der Angiogenese schließen (19).

Das FLI1-Protein und -Gen spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese primitiver neuroektodermaler Tumore (kurz PNET) und des Ewing-Sarkoms (20). Die meisten dieser Tumore weisen dabei die Translokation t (11;22) (q24;q12) auf, welche zu einer Fusion des Ewing Sarcoma (im folgenden kurz EWS)-Gens auf Chromosom 22 mit dem FLI1-Gen auf Chromosom 11 führt (31). Das so entstandene EWS/FLI1-Fusionsprodukt fungiert als aberranter Transkriptionsfaktor, besitzt aber weitestgehend die DNA-Bindungsstelle von FLI1 (32).

### **1.6.1. FLI1 und SPN**

SPNs stellen eine wichtige Differentialdiagnose zu den o.g. Ewing-Sarkomen dar, weisen jedoch keine EWS/FLI1-Translokation auf (20). Eine nukleäre Über-, bzw. Fehlexpression von FLI1 könnte jedoch ähnliche funktionelle Konsequenzen haben wie diese Translokation, da FLI1 in 63% der SPNs auf Proteinebene aberrant exprimiert wird und eine positive Korrelation zu der Expression von Cyclin D1 aufweist (4). Die Überexpression von FLI1 auf

RNA-Ebene ist mit 81% der Fälle sogar noch ausgeprägter (6).

Diese bekannte aberrante FLI1-Expression in der SPN sowie das onkogene Potential dieses Transkriptionsfaktors eröffnen die Frage nach nachgeschalteten Genen und Pathways, welche die onkogene Transformation sowohl in SPNs als auch möglicherweise in weiteren Pankreastumoren mediiieren (6).

Der Wnt-Inhibitor Dickkopf1 (im folgenden kurz DKK1) stellt ein solches EWS/FLI1-Transkriptionsziel dar (s.u.) (32).

## **1.7. DKK1**

DKK1 ist ein zu der Familie der DKK 1-4 Gene gehörendes extrazelluläres Signalmolekül, welches an den LRP-Rezeptor bindet und dessen Gen sich auf Chromosom 10q11 befindet (22).

Durch diese Bindung an den Wnt Co-Rezeptor LRP5/6 wird eine Komplexbildung mit Wnt und Frizzled verhindert und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg somit blockiert (21). Folglich wird intrazelluläres  $\beta$ -Catenin durch Aktivierung seines Abbaukomplexes degradiert, was seine nukleäre Translokation verhindert und so die Transkription der potenziell onkogen wirkenden Wnt-Zielgene (z.B. Cyclin D1 oder cMyc) durch den nukleären T-cell-specific-transcription-factor (TCF) unterdrückt (21).

Zudem wird die Transkription des DKK1-Gens durch eine Bindung von  $\beta$ -Catenin/TCF an seine Promotorregion induziert (32), wodurch zusätzlich ein negatives Feedback auf den Wnt-Signalweg entsteht (34).

DKK1 spielt eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung (34). Seine Expression ist dabei in Tumorzellen mit  $\beta$ -Catenin/TCF-vermittelter Transkription (z.B. Hepatoblastom, hepatozelluläres Karzinom, Multiples Myelom, Prostatakarzinom, Wilms-Tumor, ovarielle/endometrioide Adenokarzinome) aufgrund von Mutationen im  $\beta$ -Catenin oder Bestandteilen seines Abbaukomplexes (APC bzw. Axin), hochreguliert (23). Eine verminderte Expression findet sich dagegen aufgrund einer DNA-Hypermethylierung in fortgeschrittenen Kolon-Karzinomen (33), wodurch die inhibierende Wirkung von DKK1 auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg verloren geht (21).

### **1.7.1. DKK1 und SPN**

Erste Analysen von DKK1 zeigten keine Hinweise einer Beteiligung dieses Signalmoleküls in der SPN-Tumorgenese, da sowohl die Erhöhung als auch Verminderung der DKK1-Expression keine signifikanten Ergebnisse zeigte (6). So ist die Hypothese, das negative Feedback von DKK1 auf den Wnt-Signalweg könne eine Erklärung für das niedrig maligne Verhalten der SPN-Tumore darstellen, vorerst in Frage gestellt (6).

### **1.7.2. DKK1 und PDAC**

In murinen PDAC-Geweben konnte immunhistochemisch zwar kein DKK1, jedoch eine  $\beta$ -Catenin Akkumulation und somit typische Komponenten eines aktivierten Wnt-Signalweges nachgewiesen werden (27). Im tumorumgebenden Normalgewebe war dies nicht der Fall (27).

Dieses Ergebnis legt folglich die Vermutung nahe, dass invasive Tumoren von Zellen ohne DKK1 Expression entstehen (27). Eine Zunahme der Expression von Wnt-Zielgenen könnte so durch einen progressiven Verlust von DKK1-exprimierenden Zellen erklärt werden (27).

## **1.8. INPP5D (SHIP1)**

Das Mitglied der INPP5-Familie Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol-5-phosphatase-1 (im folgenden kurz SHIP1)-Gen (Synonym = inositol polyphosphate-5-phosphatase D = im folgenden kurz INPP5D), dessen Gen sich auf Chromosom 2q37 befindet, reguliert als Phosphatase u.a. den Phosphoinositid-3-Kinase (in folgenden kurz PI3K)-Signalweg (35).

Exprimiert wird dieses Proteins v.a. in hämatopoetischen Zellen, wo es als ein negativer Regulator des Überlebens und der Proliferation fungiert (29).

INPP5D spielt eine Rolle in der Aktivierung und Proliferation von myeloiden Zellen, Makrophagen und Mastzellen und ist an der Entstehung verschiedener Leukämien beteiligt, besonders als ein negativer Regulator bei chronischen myeloiden Leukämien und anderen, die das BCR/ABL-Fusionsprotein aufweisen (29).

In der durch das Friend murine leukemia virus (im folgenden kurz F-MuLV) verursachten Erythroleukämie konnte bereits, vermutlich durch die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges, eine INPP5D Down-Regulierung nachgewiesen werden (29). Durch diesen onkogenen Pathway kommt es zu einer Überexpression des Transkriptionsfaktors FLI1, wodurch die normalerweise Erythropoetin-induzierte Zell-Differenzierung zu einer Proliferation nicht mehr ausdifferenzierter Zellen wechselt (29). Jedoch ist der genaue Mechanismus dieser erhöhten Proliferation transformierter Zellen durch FLI1 noch nicht gänzlich geklärt (29). Es wurde bisher lediglich nachgewiesen, dass INPP5D durch FLI1 in Tumorzellen negativ reguliert wird (29). Eine mögliche Erklärung für diesen Mechanismus stellt die Hypothese dar, dass FLI1 die Aktivierung des PI3K/AKT-Pathways fördert, indem es direkt an eine spezifische FLI1 Ets-DNA-Bindestelle des INPP5D-Promoters bindet und so die INPP5D-Transkription unterdrückt (29). Somit würden sich INPP5D und FLI1 gegenseitig in einer negativen Feedback-Schleife regulieren und INPP5D ein direktes FLI1-Ziel darstellen (29). Folglich würde INPP5D durch die negative Feedback-Schleife von FLI1 immer stärker herunter reguliert, evtl. bis zum kompletten Verlust seiner Expression in immer fortgeschrittenen Erythroleukämien (29).

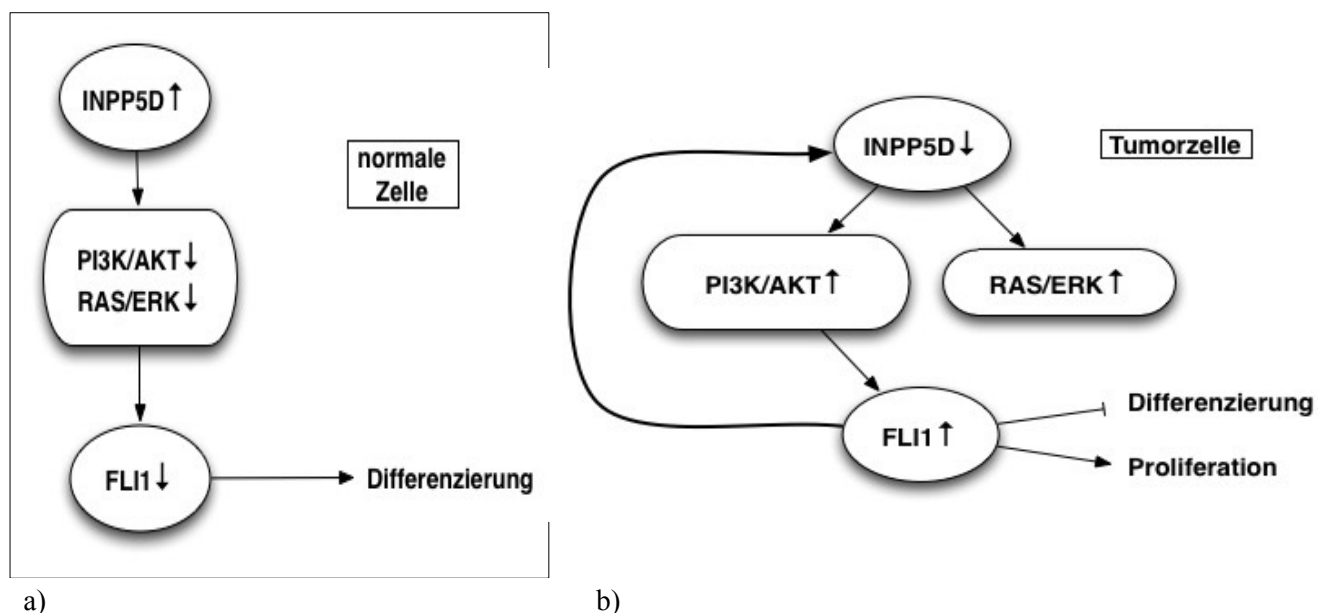


Abb 2: Modell der negativen Feedback-Schleife von FLI1 und INPP5D in einer normalen Zelle (a) sowie in einer Tumorzelle (Leukämiezelle) (b) (nach (29))

### **1.8.1. INPP5D und SPN**

Ein signifikanter Unterschied der INPP5D-Expression in der SPN verglichen zum Pankreas-Normalgewebe konnte in ersten Analysen nicht aufgezeigt und somit eine Beteiligung von INPP5D in der SPN-Tumorgenese bis auf weiteres nicht bestätigt werden (6). Zudem wurde die aufgestellte Hypothese, dass die für Erythroleukämien gültige negative Feedback-Schleife von FLI1 und INPP5D für SPNs ebenfalls erfüllt werden könne, vorerst in Frage gestellt (6).

### **1.8.2. INPP5D und PDAC**

INPP5D als Inaktivator des anti-apoptotischen und potenziell onkogenen PI3K/AKT-Signalweges, spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen (Leukämien, Lymphome) (36). Als möglicher Tumorsuppressor ist seine Proteinexpression in diesen Neoplasien reduziert bzw. mutiert (36).

Ebenso konnte bereits eine supprimierte INPP5D-Expression sowie reduzierte INPP5D-Aktivität und auf diesem Weg eine Aktivierung des proliferations-induzierenden PI3K/AKT-Signalweges in murinen Pankreaskarzinomen gezeigt werden (36). Hier führt die mangelnde Expression von INPP5D zu einer Expansion von MDSC (engl.: myeloid-derived suppressor cells), welche die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen) unterdrücken und somit das Wachstum des Tumors begünstigen (36).

## **1.9. BCL9**

B-cell lymphoma 9 (im folgenden kurz BCL9) ist ein Ko-Aktivator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges und wird in verschiedenen Tumorzellen (z.B. B-ALL, kolorektale Karzinome, Mammakarzinome), jedoch nicht in dem dazugehörigen Normalgewebe, vermehrt exprimiert (22). BCL9 steigert über eine direkte Bindung an  $\beta$ -Catenin dessen Transkriptionsaktivität, was durch eine Hochregulierung der Wnt-Zielgene (z.B. c-Myc und AXIN2 in kolorektalen Karzinomen (37)) in einer erhöhten Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierungspotenzial der Tumorzellen resultiert (22). Wnt-Zielgene, wie CD44 als Mediator der Metastasierung sowie der vascular endothelial growth factor (im folgenden kurz

VEGF), welcher die Angiogenese induziert und vermutlich durch Proliferation von Endothelzellen in der gefäßreichen Tumorumgebung die Tumorgenese fördert, sind dabei von entscheidender Bedeutung (38).

BCL9 selbst besitzt jedoch keine transkriptionelle Aktivität, sondern rekrutiert das nukleäre Protein Pygopus als Co-Faktor der Transkription an  $\beta$ -Catenin (39). Daher ist BCL9 ein positiver Regulator des Wnt-Signalweges und obligatorisch für die TCF-medierte Transkription der Wnt-Zielgene (37). Untersuchungen an BCL9 Proteinen, dessen Pygo- und  $\beta$ -Catenin-Bindungsstellen eliminiert wurden, deuten jedoch auf das Vorhandensein eines zusätzlichen unbekannten Liganden von BCL9 hin, welcher eine entscheidende Rolle für die Funktion des Proteins in der Wnt-medierte Transkription spielt (37).

Amplifikationen von BCL9 auf Chromosom 1q21 sowie eine BCL9 Überexpression wurden bereits in einer Vielzahl von verschiedenen Karzinomen (z.B. kolorektales Karzinom, Multiples Myelom) gefunden und sind mit einer Tumorprogression, einer verringerten Überlebensrate und einem schlechten klinischen Outcome assoziiert (22). In Zellen des kolorektalen Karzinoms, dessen Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert ist, wird BCL9 als Wnt-induziertes Gen überexprimiert (37). Es wird zudem angenommen, dass BCL9 Teil einer positiven Feedback-Schleife auf den Wnt-Signalweg ist und so unabhängig von Wnt-Liganden zu einer Progression der kolorektalen Karzinome führt (37). Durch diese alternative Aktivierung des Wnt-Signalweges durch Dysregulierung der BCL9 Expression mit der Folge einer Tumorprogression, kann BCL9 als mögliches Onkogen betrachtet werden (38).

Eine pharmakologische Dissoziation und somit Hemmung der BCL9/ $\beta$ -Catenin-Interaktion resultiert hingegen in einer selektiven Unterdrückung der onkogenen Wnt-Transkription (22). Durch die daraufhin supprimierte Expression der Wnt-Zielgene c-Myc, Cyclin D1, CD44 und VEGF kommt es zu entsprechenden Anti-Tumor-Effekten (22). Auf diese Weise konnte bereits das Tumorwachstum sowie die Angiogenese, Invasion und Metastasen-Bildung in murinen Xenograft-Modellen bei kolorektalen Karzinomen und Multiplen Myelomen unterdrückt werden (22).



## **2. Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die molekulare Basis des erstaunlich benignen Verhaltens der SPN angesichts des aktivierten Wnt-Signalweges und der Cyclin D1-Überexpression, welche normalerweise beide mit aggressiven Tumoren assoziiert sind, beleuchtet werden. Hierzu wurde die RNA-Expression der Gene FLI1 sowie DKK1 und INPP5D (SHIP1) als durch FLI1 regulierte Gene und BCL9 als Bestandteil des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges untersucht. Neben der SPN wurde zusätzlich eine mögliche Bedeutung dieser Gene im aggressiven PDAC sowie dessen Vorläuferläsion der IPMN geprüft.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Patienten**

Insgesamt wurden 17 Pankreas-Normalgewebe der Jahrgänge 2006-2010, 12 PDAC- (Jahrgang 2012) und 12 IPMN-Tumorgewebe (Jahrgänge 2008-2013) aus dem Archiv des Instituts für Hämatopathologie Hamburg sowie 20 SPN-Tumorgewebe des Pankreas (Jahrgänge 2004-2008), zur Verfügung gestellt aus dem Archiv von Prof. Dr. G. Klöppel, ehemaliger Direktor des Pathologischen Instituts Kiel, untersucht. Hierbei wurde auf eine ausreichende Qualität und ein möglichst niedriges Alter der Paraffingewebe (wegen des früher verwendeten ungepufferten Formalins, welches die Analyse und Auswertung aufgrund einer stärkeren Degradation erschwert bzw. unmöglich macht) geachtet. Von den Tumorgeweben galt es ein möglichst reines Tumorareal ohne gesundes oder alteriertes Gewebe in ausreichender Menge zu erhalten. Infiltrationen, insbesondere durch Entzündungszellen, Nekrosen oder Bindegewebsreaktionen, sollten sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe vermieden werden.

Da die Tumor- und Normalgewebe vor der Verwendung anonymisiert wurden, stellt diese Arbeit kein „Forschungsvorhaben am Menschen“ im Sinne des § 9 Abs. 2 des Hamburgischen Kammergesetzes für Heilberufe dar und zählt auch nicht unter die nach § 15 Abs. 1 der Berufsordnung für Hamburger Ärzte und Ärztinnen beratungspflichtigen Forschungsvorhaben. Eine Beratung durch die Ethikkommission war daher nicht erforderlich.

### **3.2. Labortechnischer Teil**

#### **3.2.1. Material**

##### 3.2.1.1. Chemikalien/Sonstiges

Ethanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
RNase freies Wasser	Ambion life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Xylen p.a.	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

### 3.2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Biosphere Filterspitzen 100, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Research Pipetten 0,5-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Feather Standard Scalpel	pfmmedical, Köln
Filterspitzen 10µl	Starlab, Hamburg
MicroAmp Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
MicroAmp Optical 8-Tube Strip 0,2 ml	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Multiply Pro Gefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Safe Seal Gefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht

### 3.2.1.3. Primer

Name	Sequenz (5' → 3')
HPRTfor	CTC ATG GAC TAA TTA TGG ACA G
HPRTrev	TGA TGT AAT CCA GCA GGT CAG
GAPDHfor	TTT GGT ATC GTG GAA GGA CTC
GAPDHrev	GAA CAT CAT CCC TGC CTC TAC
FLI1for	CCA GAT CCG TAT CAG ATC CTG
FLI1rev	CAA CGC CAG CTG TAT CAC CT
DKK1for	GCA TGC GTC ACG CTA TGT GC
DKK1rev	TGG TAA TGA TCA TAG CAC CTT GG
INPP5Dfor	ACG GAG CGT GAT GAA TCC AG
INPP5Drev	CAG CAT CAC TGA AAT CAT CAA C
BCL9for	CCA TGA TGC TAT CAA GAC TGT G
BCL9rev	CGA GGA TTC TGT GTA TTA ATG C

Tab. 1: verwendete Primer

Alle forward und reverse Primer wurden von der TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin synthetisiert.

### 3.2.1.4. Sonden

Die Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems life technologies, Carlsbad, Californien, USA synthetisiert.

### 3.2.1.5. Komplett-Systeme (Testkits)

One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy FFPE-Kit	Qiagen, Hilden

### 3.2.1.6. Laborgeräte

Genetic Analyzer 3130	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Harmony Vortex Mixer VTX-3000L	medigene, Puchong, Selangor DE, Malaysia
Hettich Mikro200 Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Lineares Färbegerät Leica ST4040	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg

#### 3.2.1.7. Software

GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
Mendeley	Mendeley Ltd., London, UK
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA

### **3.2.2. Probenvorbereitung**

#### 3.2.2.1. manuelle Mikrodisektion der Gewebeproben

Um das Tumorgewebe in ausreichender Reinheit von dem Normalgewebe aus den Gewebeschnitten zu isolieren, wurde eine manuelle Mikrodisektion durchgeführt. Von der formalinfixierten, in einen Paraffinblock eingebetteten Gewebeprobe wurden dabei zunächst mithilfe eines Mikrotoms vier 5-10 µm dicke Serienschnitte angefertigt und jeder anschließend auf einen Objektträger gezogen. Einer der Schnitte wurde routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin (Hämalaun nach Mayer, Eosin 1%) in dem Linearfärber Leica ST4040 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) angefärbt. Die anschließende Markierung der Tumoreale und Normalgewebe erfolgte durch einen Pathologen unter dem Lichtmikroskop, der mit einem Permanentmarker die entsprechenden Bereiche umkreiste. Über die so

entstandenen Vorlagen wurden anschließend die restlichen 3 ungefärbten Schnitte gelegt, mit einem runden Skalpell entlang der markierten Konturen manuell mikrodiseziert und die dadurch entstandenen Späne in 1,5 ml-Tubes abgeklopft.

Dieser Vorgang wurde mit allen ausgewählten Paraffinblöcken durchgeführt.

### 3.2.3. Entparaffinierung

Um für die Analyse der RNA das Paraffin aus den Proben herauszulösen, wurden sie nach der Mikrodisektion 2x in 950 µl Xylol unter einer Dampfzughaube aufgenommen, kurz gevortext, 5 Minuten bei 19.000 x g abzentrifugiert, der entstandene Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen.

Bei der nachfolgenden Alkoholbehandlung wurden 950 µl Ethanol den Proben zugeführt, ebenfalls gevortext, 5 Minuten bei 19.000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Auch dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt. Abschließend wurden die offenen Tubes bei 40°C für ca. 20 Minuten in einem Heizblock getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung der Proben bei -80 °C.

### 3.2.4. RNA-Extraktion

Für die Isolierung der RNA von den restlichen Bestandteilen der Proben wurde der RNeasy FFPE (= Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (tissue)) Kit der Firma Qiagen verwendet.

Es wurden die in Tabelle 2 beschriebenen Schritte durchgeführt.

Schritt	Durchführung
Lyse der Probe	Zugabe von 150µl PKD Puffer und 10µl Proteinase K; Inkubation im Thermoblock: 1 h (55°C) + anschließend 15 min (80°C)
Entfernung genomischer DNA (gDNA)	Zugabe von 320 µl RBC-Puffer + auf gDNA Eliminator Mini Spin Columns auftragen; 30 sec zentrifugieren (8.000 x g);

Isolierung der Gesamt-RNA	gDNA-freier Durchfluss: mit 720 µl 100% Ethanol (bessere Bindung der RNA an der RNeasy Silica-Gel-Membran) vermischen und je 600 µl des Gemisches 2x auf 1 Mini-Säule auftragen; 15 sec zentrifugieren (8.000 x g)
3 Waschschrte	1.: Zugabe von 500 µl RPE-Puffer, zentrifugieren: 15 sec (8.000 x g); 2.: 500 µl RPE-Puffer, 2 min (8.000 x g); 3.: 500 µl 80% abs. Ethanol, 15 sec (8.000 x g)
Trockenzentrifugation	5 min zentrifugieren (19.000 x g)
Eluieren der RNA	Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser; 1 min bei 18.000 x g zentrifugieren → die RNA befindet sich nun im Eluat

Tab. 2: Durchführung der RNA-Extraktion

Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert, um den Schutz und die Stabilität der RNA zu gewährleisten.

### 3.2.5. Qualitative RNA-Kontrolle

Um zu gewährleisten, dass auch nach der Formalin-Fixierung in den Paraffinblöcken eine ausreichende Menge amplifizierbarer RNA für die anschließende quantitative Analyse der Proben vorliegt, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Polymerase Chain Reaction, im folgenden kurz PCR) zur qualitativen RNA-Kontrolle durchgeführt.

Für die Amplifikation mittels PCR wurde die RNA zunächst durch die Reverse Transkription (im folgenden kurz RT) in DNA umgewandelt. Nach der PCR folgte eine Fragmentanalyse.

Für den Nachweis intakter RNA aus den Gewebeproben diente das Gen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (im folgenden kurz HPRT), ein eukaryotisches Enzym im Purin-Stoffwechsel. Als sogenanntes Housekeeping-Gen ist es für den Zellstoffwechsel essentiell, weshalb es in allen Pankreaszellen ständig in gleich bleibender Menge bereitgestellt werden muss. Folglich werden diese Gene auf relativ konstantem Niveau weitgehend unabhängig von anderen Einflüssen transkribiert. Es gilt: je länger ein nachzuweisendes PCR-Produkt ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit degradiert zu werden und je geringer die Expression in der Zelle ist, desto früher kann es bei Degradation nicht mehr nachgewiesen werden. Das

PCR-Produkt von HPRT hatte deshalb eine größere Länge als die PCR-Produkte der zu untersuchenden Gene. Zusammen mit seiner niedrigen Expression pro Zelle ist HPRT somit ein empfindlicher Marker für die RNA-Degradation und bestimmt folglich die RNA-Qualität der Gewebe.

#### 3.2.5.1. Primer-Design und -Kontrolle

Für die Durchführung der anschließenden qRT-PCR wurden für jedes Gen spezifische Primer entworfen, welche mehrere Exons einschließen und so sicherstellen, dass ohne Verunreinigungen durch genomische DNA ausschließlich die gespleißte mRNA quantitativ gemessen wird. Die Validierung der Primer erfolgte im Rahmen der vorausgegangenen Diplomarbeit (6).

#### 3.2.5.2. Ansatz und Durchführung der qualitativen RT-PCR

Je 1 µl der aus dem Patientenmaterial gewonnenen RNA wurde zusammen mit 19 µl eines vorher angefertigten Masermixes in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

RNAse freies H <sub>2</sub> O	(-20°C)	7,8 µl
5x Puffer	(-20°C)	4,0 µl
Q-Solution	(-20°C)	4,0 µl
10 mM dNTPs	(-20°C)	0,8 µl
Primer hprt forward	(4°C)	0,8 µl
Primer hprt reverse	(4°C)	0,8 µl
Emzym-Mix	(-20°C)	0,8 µl

Es wurde der QIAGEN One-Step RT-PCR Kit verwendet. Der Enzym-Mix enthielt die Reverse Transkriptase und eine TaqPolymerase. Der reverse Primer wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff 6-FAM markiert, welcher später im Genetic Analyzer bei vorhandener RNA nachgewiesen werden konnte.



Um Fehler in der Durchführung des Verfahrens auszuschließen, wurden in jedem Durchlauf zusätzlich sowohl eine Positivkontrolle (1µl eines beliebigen Patientenblutes, da hier ein RNA-Nachweis leicht möglich ist) als auch eine Negativkontrolle (1µl H<sub>2</sub>O) angefertigt. Sollte in der Positivkontrolle kein Signal erfasst werden können, würde dies für einen Fehler in der Durchführung sprechen. Mithilfe der Negativkontrolle galt es Verunreinigungen der Proben auszuschließen.

Die Amplifikation erfolgte im Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA), einem automatisierten Thermostat.

Nach dem Schritt der Reversen Transkription (50°C, 30 min) wurden 45 Zyklen der folgenden Zeitintervalle durchlaufen:

Denaturierung	→ 95°C, 15 sec
Annealing	→ 60°C, 30 sec
Extension	→ 72°C, 30 sec

Anschließend erfolgte die Auswertung der qualitativen PCR mithilfe des Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems life Technologies, Carlsbad, Californien, USA), einem vollautomatischen Kapillarelektrophorese-Gerät mit 4 Kapillaren. Ein Laser regte dabei den Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM an, sobald dieser den detektierbaren Bereich erreichte. Durch eine CCD-Kamera (charge-coupled device = ladungsgekoppeltes Bauteil) konnte dieses Fluoreszenzsignal abgelesen und mit der entsprechenden Software bearbeitet werden. Die Signalintensitäten der Tumor- und Normalgewebe konnten nun in artificial units (im folgenden kurz AU) abgelesen werden, wobei Werte > 1.000 AU als ausreichend gewertet wurden.

#### 3.2.5.3. Integritätskontrolle der Tumorgewebe

Um die zu untersuchenden Gewebe auf das Vorhandensein intakter RNA zu untersuchen, erfolgte eine qualitative RT-PCR mit anschließender Fragmentanalyse im Rahmen der Diplomarbeit (6).

Die zuvor festgelegte Mindestsignalintensität von 1.000 AU konnte in allen Proben

nachgewiesen werden. Von den ursprünglich 11 Proben Normalgewebe zeigten 9 nach der Auswertung am Genetic Analyzer eine Signalstärke von 1.500 – 10.000 AU, die als ausreichend bewertet wurde. Auch von den 20 SPN-Tumorproben konnten 18 aufgrund der gemessenen Signalstärke von nach der RNA-Kontrolle für die weiteren Untersuchungen verwendet werden. Ebenso erreichten alle 12 untersuchten PDAC-Proben sowie jedes der 12 IPMN-Tumorgewebe die erforderliche Mindestintensität.

### **3.2.6. Herstellung der Referenzprobe aus Normalgewebe**

Von 6 Patienten wurden insgesamt 17 Proben gesundes Pankreasgewebe (Normalgewebe) gewonnen, welche im Rahmen der Diplomarbeit einer qualitativen RNA-Kontrolle unterzogen wurden (6).

14 der 17 Proben wiesen hierbei ausreichend starke Signalintensitäten mit Werten von > 1.000 AU auf und wurden schließlich zu einer Referenzprobe gepoolt, welche nun für die quantitative Echtzeit-PCR verwendet werden konnte. Die Expression der fünf Gene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (im folgenden kurz GAPDH = interne Kontrolle/Referenzgen), FLI1, DKK1, INPP5D und BCL9 in dieser Referenzprobe wurde hierbei jeweils in dreifacher Ausführung untersucht und der jeweils mittlere Wert in die Berechnung aufgenommen.

Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalem papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

### **3.2.7. Quantitative Echtzeit-PCR**

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (englisch: real-time quantitative PCR, im folgenden kurz qRT-PCR) konnte mittels fluoreszenzmarkierten Sonden die Menge der amplifizierten RNA nachgewiesen werden. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte dabei in Echtzeit, d.h. bereits während der PCR.

### 3.2.7.1. Funktionsprinzip der quantitativen TaqMan-PCR

Bei dieser sequenzspezifischen Detektion bedient man sich kurzer, zur Template-DNA komplementärer DNA-Stücke. Diese so genannten TaqMan-Sonden hybridisieren im mittleren Bereich der Zielsequenz zwischen den beiden Primern. An ihrem 5'-Ende tragen sie den fluoreszierenden Reporterfarbstoff Fluorescein, welcher gelbes Licht bei einem Absorptionsmaximum von 485 nm absorbiert und bei 515 nm blaugrünes Licht emittiert. Am 3'-Ende tragen die TaqMan-Sonden ein als Quencher bezeichnetes Molekül, welches in der Nähe befindliche Farbstofffluoreszenzen abfängt. Da er keine eigenständige Fluoreszenz besitzt, wird er auch als nicht-fluoreszierender Quencher (im folgenden kurz NFQ) bezeichnet.

Solange die Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Ursache hierfür ist die räumliche Nähe zum Farbstoff des Quenchers, wodurch der sogenannte Fluoreszenzresonanzenergietransfer (im folgenden kurz FRET) entsteht. Das durch eine Lichtquelle angeregte Donor-Fluorochrom (Reporter) gibt dabei einen Teil seiner Energie an den in der Nähe befindlichen Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) ab. Nimmt nun der Abstand zwischen Reporter und Quencher zu, verringert sich der FRET und somit auch das Signal des Akzeptors, während das des Donors zunimmt. Wird der Reporter während der PCR-Reaktion bei Anwesenheit der Zielsequenz durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase abgespalten, entzieht sich dessen Farbstoff aus dem Einflussgebiet des Quenchers. Erst jetzt, nach Spaltung der Sonde, ist es möglich, die Fluoreszenz des Reportermoleküls zu detektieren. Dieses im Verlauf der Reaktion zunehmende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Menge (Quantität) der gebildeten DNA-Stränge. Dabei gilt: je höher die anfängliche Menge an DNA, desto früher kann eine signifikante Fluoreszenzverstärkung festgestellt werden.

Eine zusammenfassende Darstellung des Funktionsprinzips der TaqMan-Reagenzien zeigt die folgende Abbildung:

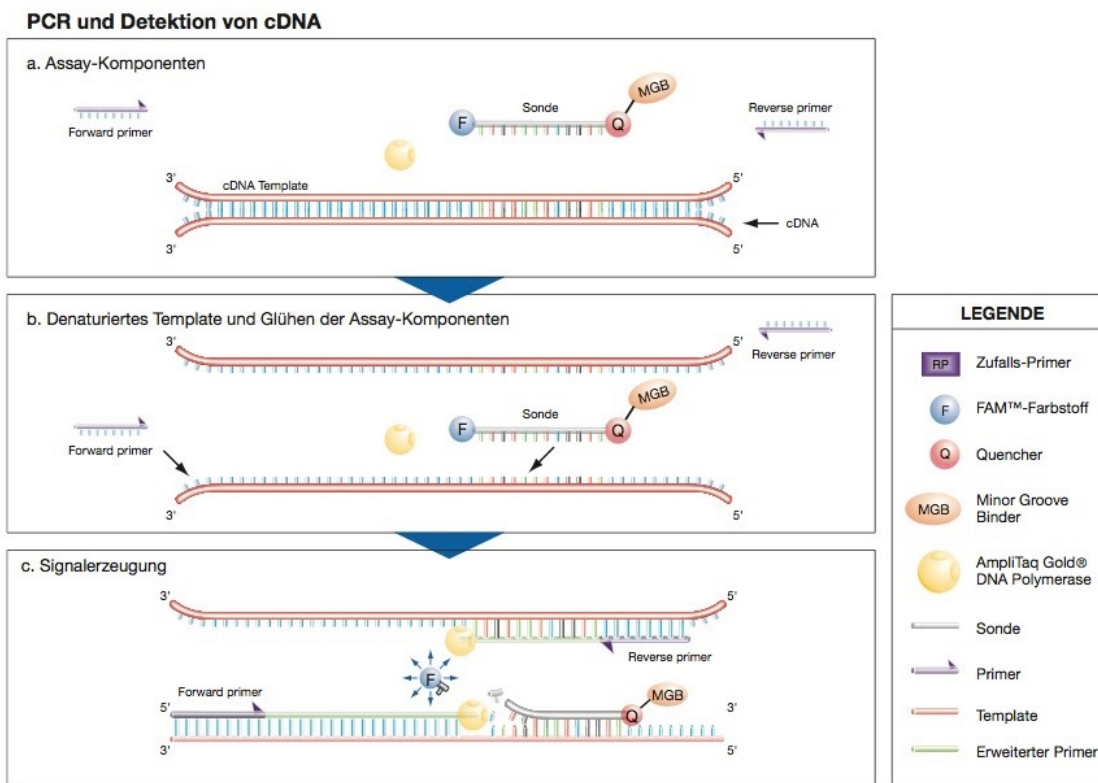


Abb. 3: Funktionsprinzip der TaqMan-Reagenzien (40)

### 3.2.7.2. Sonden-Kontrolle

Die Kontrolle der für die qRT-PCR entworfenen Sonden fand im Rahmen der Diplomarbeit statt (6).

### 3.2.7.3. Ansatz und Durchführung der TaqMan-PCR

Zur Quantifizierung der fraglichen Gene wurde für jeden PCR-Ansatz mithilfe eines QuantiTect Probe RT-PCR Kit der Firma Qiagen ein Reaktionsmix (Mastermix) pipettiert, welcher sich aus folgenden Reagenzien zusammensetzte:

RNAse freies H <sub>2</sub> O	(-20°C)	4,8 µl
2x Mastermix (Step One)	(-20°C)	10 µl
Primer FOR	(4°C)	1 µl
Primer REV	(4°C)	1 µl
MGB-Sonde (FAM)	(4°C)	1 µl
Enzym-Mix	(-20°C)	0,2 µl

Der Enzym-Mix enthielt sowohl die Reverse Transkriptase als auch die DNA-Polymerase.

Die verwendeten Sonden waren spezifisch für die jeweiligen Gene:

Name	Sequenz (5' → 3')
GAPDH	CAT GCC ATC ACT GCC
FLI1	CAG ATC CAG CTG TGG CAA
DKK1	CTG ATC AAA ATC ATT TCC
INPP5D (SHIP1)	AAG TCA CTA GCA GGG CC
BCL9	CGA GGA TTC TGT GTA TTA ATG C

Tab. 3: verwendete Sonden

Nach dem Übertragen von 18 µl Mastermix in je ein Tube der MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips erfolgte das Hinzugeben von jeweils 2 µl Patienten-RNA. Dabei wurden von jeder Probe je 2 Replikate mit identischen Reaktionsvolumina und -komponenten unter identischen Bedingungen angefertigt. Entsprechend der Reaktionsplattenbelegung wurden zudem drei Kontrollproben (Reference Samples; =RNA aus Normalgewebe des Pankreas) sowie eine H<sub>2</sub>O-Negativkontrolle, welche keine Amplifikation zeigen sollte, da sie nur Wasser statt der Proben enthält, angefertigt. Dafür wurden ebenfalls je 2 µl zu den 18 µl Mastermix hinzugefügt.

Um eventuelle Luftblasen in den Reaktionsansätzen zu vermeiden, wurde abschließend jedes Reaktionsgefäß bei 19.000 x g für eine Minute zentrifugiert und in den StepOne™ (Applied Biosystems) eingelegt, wo nun die Durchführung der TaqMan-PCR erfolgte. Mit Hilfe des Single Target Expression Profiling (im folgenden kurz STEP) ist es möglich, die Expression eines bestimmten Gens in unterschiedlichen Proben zu betrachten.

Der StepOne™ durchlief dabei in 50 Zyklen die in Abb. 4 dargestellten Zeitintervalle:

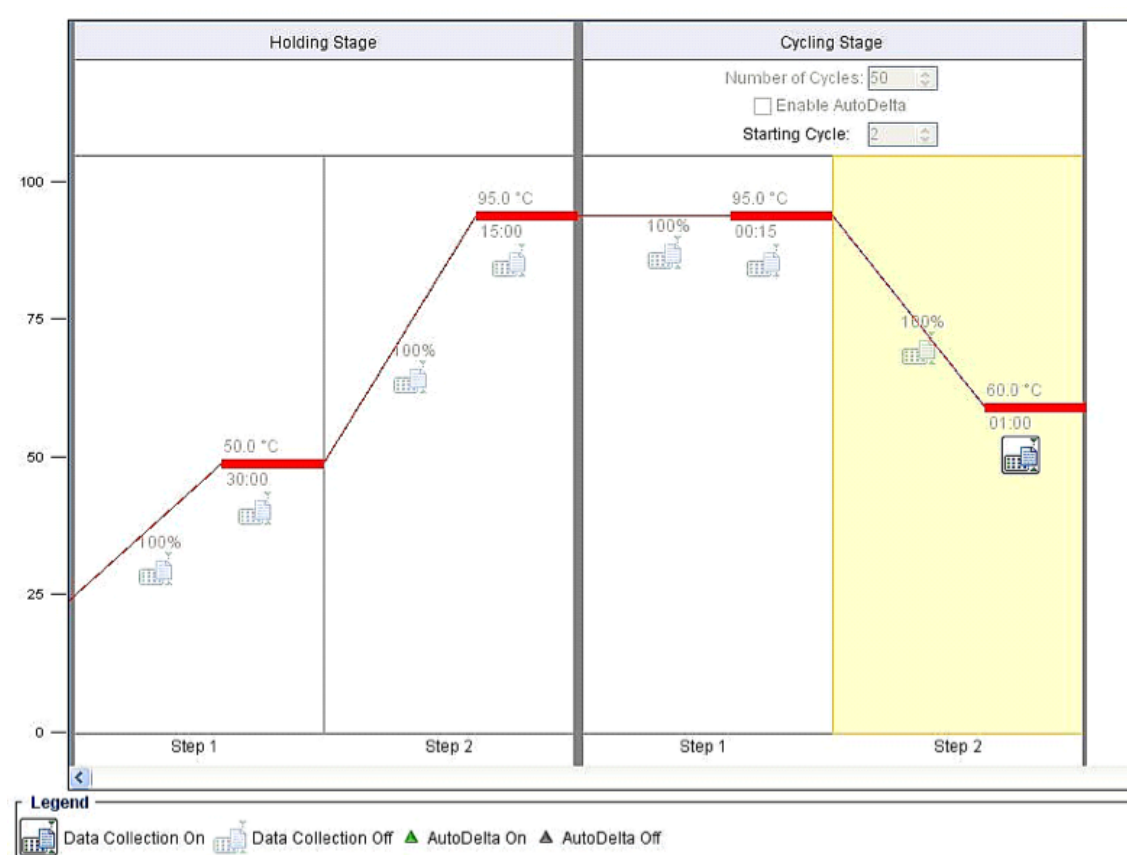


Abb. 4: Thermoprofil der qRT-PCR (StepOne)

Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktaalen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktaalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

### **3.2.8. Quantifizierung**

#### 3.2.8.1 Ct-Wert

Für die Mengenbestimmung der PCR-Produkte bedient man sich der mittleren Phase der PCR, in der sich tatsächlich die Anzahl der DNA-Matrizen bei jedem Zyklus beinahe verdoppelt und welche deswegen auch als exponentielle Phase bezeichnet wird. Nur dort ist eine korrekte Quantifizierung möglich, da in dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Ursache dafür ist die anfänglich begrenzte Templatemenge, was die Wahrscheinlichkeit auf Primer und Polymerase zu treffen einschränkt.

Um den Anfang der exponentiellen Phase, an dem die gesuchte Fluoreszenz zum ersten mal signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt, messen zu können, wurde der Schwellenwert-Zyklus (engl. Cycle Threshold, im folgenden kurz Ct-Wert) verwendet. Am Ct befindet sich unter idealen Bedingungen in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neusynthetisierter DNA.

#### 3.2.8.2. Relative (= vergleichende) Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wurden nicht die absoluten Startkonzentrationen oder Kopienzahlen der Zielgene (= Tumorgewebe) bestimmt, sondern die Expression der mRNA wurde auf die des Housekeeping-Gens GAPDH (= interne Kontrolle/Referenzgen) bezogen. Diesen Vorgang nennt man auch Normalisierung der Expressionsergebnisse:

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}.$$

So konnte die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert werden, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen, die Integrität der extrahierten RNA sowie Fehler bei der Reversen Transkription gleichermaßen Zielgen und Housekeeping-Gen betrafen.

Anschließend wurden die relativen Expressionen der Zielgene auf ein Kontrollprobenmaterial (=Normalgewebe) bezogen, d.h. die Expression des Zielgens im Tumorgewebe wurde im Verhältnis zu seiner Expression im Normalgewebe analysiert:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Patient} - \Delta Ct \text{ Kontrollgen}.$$

Der als Ratio bezeichnete relative Expressionsunterschied zwischen dem Zielgen und der Kontrolle ließ sich nun mit der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode aus folgender Formel errechnen:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (41).$$

Voraussetzung hierfür war eine annähernd optimale qRT-PCR-Effizienz in allen Proben, was einer Verdopplung der DNA-Produktmenge in jedem Zyklus entspricht (= 2 in der arithmetrischen Formel).

In jeder PCR wurde das Zielgen für jede Tumorprobe in zweifacher Ausführung gemessen, wovon jeweils der Mittelwert für die Berechnung verwendet wurde. Von den dreifach bestimmten Positivkontrollen pro Durchlauf wurde die Rechnung mit dem mittleren Wert durchgeführt. Bei zu großer Diskrepanz der Proben hätte dies auf einen Fehler in der Probenbearbeitung gedeutet.

Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktaalen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktaalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

### 3.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Um die Expression von FLI1, DKK1, INPP5D und BCL9 in den verschiedenen Tumorgeweben mit deren Expression im gesunden Pankreasgewebe vergleichen zu können, erfolgte eine statistische Evaluierung der Daten mittels zweiseitigem Einstichproben-t-Test (engl.: one sample t-test). Für die Durchführung des Tests wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Da die Ratios logarithmisch verteilt sind, für den t-Test aber eine Normalverteilung Voraussetzung ist, wurde der Logarithmus zur Basis 2 der Ratios für den Test verwendet. Dadurch ergibt sich für das Pankreas-Normalgewebe eine ratio von 0 (=  $\log_2(1)$ ). Die Normalverteilung der Ratios wurde mittels D'Agostino-Pearson Test (Normalitätstest) überprüft, ebenfalls unter Verwendung von GraphPad Prism 5. Um eine Verzerrung der Daten zu vermeiden wurde von jedem Patienten nur ein Wert verwendet. Lagen durch die Untersuchung mehrerer Gewebeproben (Paraffinblöcke) eines Patienten mehrere Werte (Ratios) vor, wurde der jeweilige Medianwert für die Durchführung der Test benutzt.



Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

### **3.3.1. Vergleich der Expressionsmuster in den verschiedenen Tumorentitäten**

Um die Expression von jedem der 4 Gene (FLI1, DKK1, INPP5D und BCL9) innerhalb der 3 untersuchten Tumorentitäten (SPN, PDAC und IPMN) vergleichen zu können, erfolgte eine statistische Auswertung der Daten mittels Zweistichproben-t-Test (engl.: two sample t-test). Für die Durchführung des Tests wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet.

Da für den t-Test neben der Varianzhomogenität und der Unabhängigkeit der Proben untereinander eine Normalverteilung der logarithmisch verteilten Ratios Voraussetzung war, wurde für den Test der Logarithmus zur Basis 2 der Ratios verwendet. Mittels D'Agostino-Pearson Test wurden auch hier die Normalverteilungen der Ratios unter Verwendung von GraphPad Prism 5 überprüft. Lagen mehrere Gewebeproben (Paraffinblöcke) und so für einen Patienten mehrere Ratios vor, wurde, um eine Verzerrung der Daten zu vermeiden, erneut der jeweilige Medianwert für die Durchführung des Tests benutzt.

### **3.3.2. Korrelation der Genexpressionen innerhalb einer Tumorentität**

Um Aussagen über mögliche Korrelationen von zwei verschiedenen Genexpressionen (z.B. FLI1 vs. DKK1) innerhalb eines Tumorgewebes treffen zu können, erfolgte die statistische Analyse mittels Pearson-Korrelationskoeffizient. Da auch für diesen statistischen Test eine Normalverteilung der logarithmisch verteilten Ratios Voraussetzung war, wurde erneut der Logarithmus zur Basis 2 der Ratios verwendet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Patientendaten**

#### **4.1.1. SPN**

Es wurden 18 SPN-Tumorgewebe des Pankreas der Jahrgänge 2004-2008 aus dem Archiv des Pathologischen Instituts in Kiel untersucht. Alle 18 untersuchten Patienten waren weiblich mit einem Alter von 15 bis 63 Jahren, da SPN bei Männern fast nicht vorkommen. Das durchschnittliche Alter betrug 32,0 Jahre.

Bei drei Tumorproben (Nr. 3, 13, 17) blieben die Patientendaten unbekannt.

#### **4.1.2. PDAC**

Es wurden 12 PDAC-Tumorgewebe des Jahrgangs 2012 aus dem Archiv des Instituts für Hämatopathologie Hamburg untersucht.

Dreiviertel aller Patienten waren männlichen Geschlechts (9 von 12), nur 3 Gewebe wurden von weiblichen Patienten bezogen. Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation reichte dabei von 44 bis zu 86 Jahren. Das durchschnittliche Alter betrug 62,3 Jahre.

#### **4.1.3. IPMN**

Es wurden 12 IPMN-Tumorgewebe der Jahrgänge 2008 – 2013 aus dem Archiv des Instituts für Hämatopathologie Hamburg untersucht, welche zu je 50% von Männern und Frauen stammten. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation im Durchschnitt 68,3 Jahre alt (37. - 82. Lebensjahr).

PDAC- und IPMN-Patienten waren damit in ähnlichem Alter, während Patienten mit SPN generell jünger sind.

## 4.2. Quantitative Analyse

Um die FLI1-, DKK1-, INPP5D- und BCL9-Expressionsmuster der jeweiligen Tumormaterialien (SPN, PDAC, IPMN) im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe beurteilen zu können, erfolgte nach qualitativer RNA-Kontrolle die Durchführung einer qRT-PCR mit den spezifisch für jedes Gen validierten Primern und Sonden.

Als Ratio wurde dabei der relative Expressionsunterschied zwischen dem Zielgen und dem Referenzgen (z.B. FLI1/GAPDH) bezeichnet. Als Standard wurde Normalgewebe verwendet. Um die inhärente Ungenauigkeit der Methode zu berücksichtigen wurde eine Expression von  $>2$  als gesteigert gewertet (in den folgenden Tabellen rot hinterlegt), von  $<0,5$  als vermindert (grün hinterlegt) und die Bereiche zwischen diesen beiden Werten ( $0,5 - 2$ ) wurden als Normbereich gewertet. Dieser Schwellenwert entsprach in der qRT-PCR-Reaktion ungefähr einem Unterschied von einem Zyklus.

Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalem papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

#### 4.2.1. FLI1

Die folgende Tabelle zeigt die Ratios von FLI1 für die jeweiligen Tumorentitäten:

Nr.	SPN	PDAC	IPMN
1	10,6	5,66	1,07
2	0,49	1,32	7,46
3	23,0	2,46	1,32
4	14,0	8,57	2,14
5	28,0	0,33	1,07
6	20,5	0,76	4,59
7	2,3	1,32	2,0
8	48,5	0,81	2,83
9	3,0	1,32	2,83
10	4,9	3,25	2,83
11	16,1	4,29	3,25
12	1,9	1,32	2,83
13	2,3		
14	24,5		
15	5,7		
16	13,5		
17	7,5		
18	0,13		

Tab. 4: Genexpressionen von FLI1 im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1).

Farbig hinterlegt sind sowohl die Über- (rot) als auch Unterexpressionen (grün) der einzelnen Gene bezogen auf die jeweiligen Proben. Die übrigen Werte befinden sich im Normbereich.

Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem dukalen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

#### 4.2.1.1. SPN

15 der 18 Proben (83%) zeigten eine 2,3 – 48,5-fache FLI1-Überexpression im Vergleich zum Referenzgewebe (gesundes Pankreasgewebe). Während Nr. 12 mit einem Wert von 1,9 als einzige Tumorprobe im Bereich des Normalgewebes lag, konnten lediglich für zwei Proben (Nr. 2 und 18) eine verringerte Expression von 0,49 bzw. 0,13 beobachtet werden.

Für FLI1 variierten die Expressionen in den verschiedenen Tumorproben in einem Bereich von 2 Größenordnungen. Nr. 8 zeigte mit einem Wert von 48,5 die stärkste Expression und Nr. 18 war die Probe mit dem niedrigsten nachgewiesenen Wert (0,13). Somit zeichnete sich FLI1 in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, wie in Diagramm 1 aufgezeigt, durch eine erhöhte Expression aus. In 9 der SPN-Tumorproben war die FLI1-Expression mehr als 10 mal höher verglichen zum Pankreas-Normalgewebe.

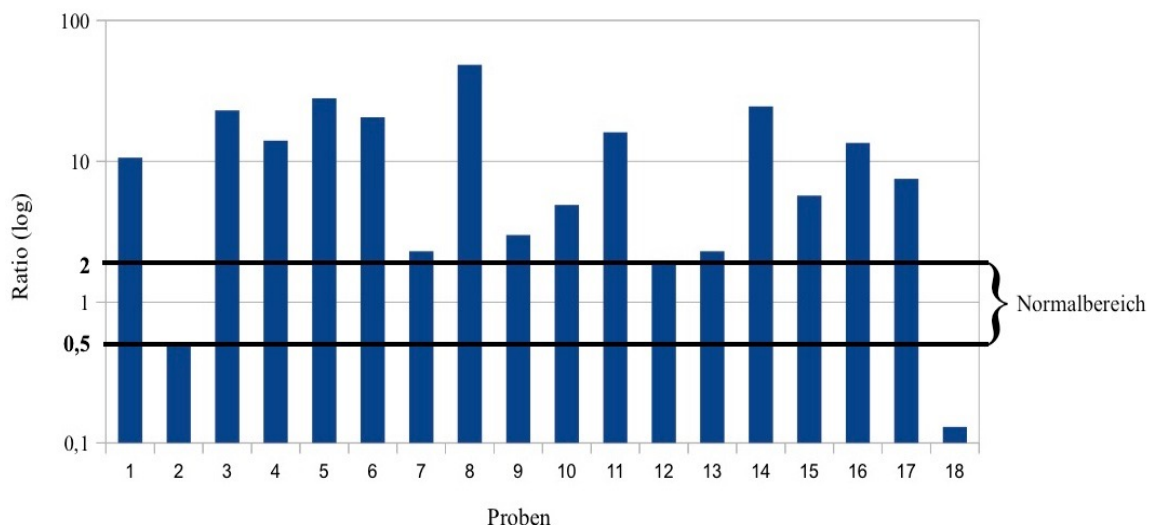


Diagramm 1: relative FLI1-Genexpressionen in der SPN

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

#### 4.2.1.2. PDAC

6 der 12 FLI1-PDAC-Tumorproben (50%) lagen mit Werten von 0,76 bis 1,32 im Bereich des Normalgewebes. Nur Probe 5 wies mit einer Ratio von 0,33 eine verringerte Expression verglichen mit der des Referenzgewebes (gesundes Pankreasgewebe) auf. In 5 Fällen (Nr. 1, 3, 4, 10, 11) zeigte sich eine 2,46 – 8,57-fache FLI1-Überexpression (41,7%).

Die Expression der FLI1 mRNA variierte dabei zwischen den einzelnen PDAC-Proben in einem Bereich von nur einer Größenordnung. Nr. 4 zeigte mit einem Wert von 8,57 die höchste mRNA-Expression, während sie in Probe Nr. 5 mit 0,33 den niedrigsten Wert annahm (siehe Diagramm 2).

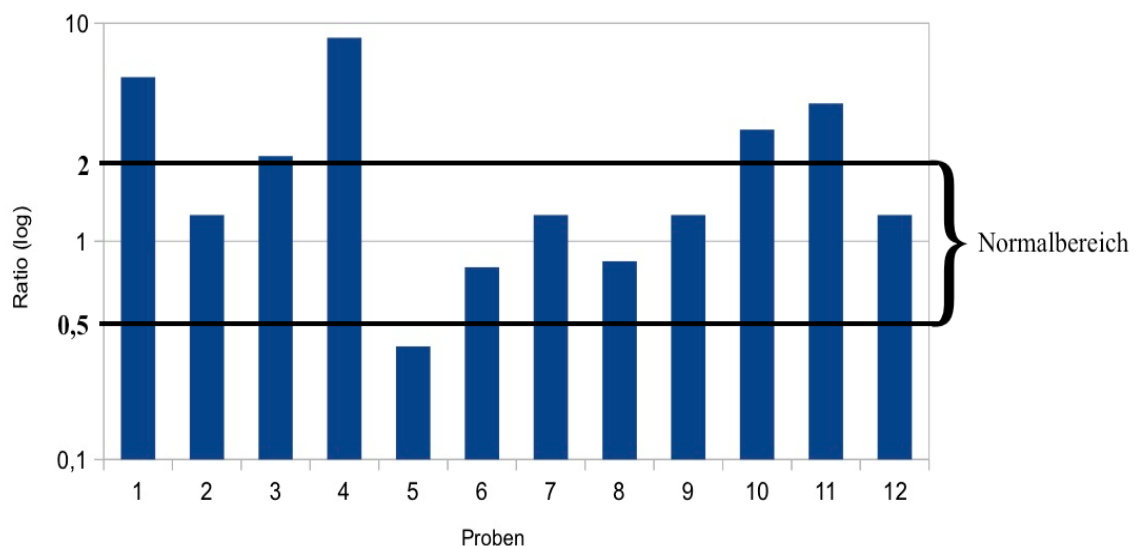


Diagramm 2: relative FLI1-Genexpressionen im PDAC

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

#### 4.2.1.3. IPMN

In der IPMN zeichnete sich FLI1 in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (8 von 12 Proben, 66,7%) durch eine 2,14 – 7,46-fache Überexpression aus. Die übrigen vier (Nr. 1, 3, 5, 7) befanden sich mit Werten von 1,07 bis 2,0 im Bereich des Referenzgewebes.

Da Nr. 5 die Probe mit dem niedrigsten nachgewiesenen Wert (1,07) und Nr. 2 mit 7,46 die stärkste Expression aufwies, variierte die Expression der FLI1 mRNA in einem nur sehr geringen Bereich (siehe Diagramm 3).

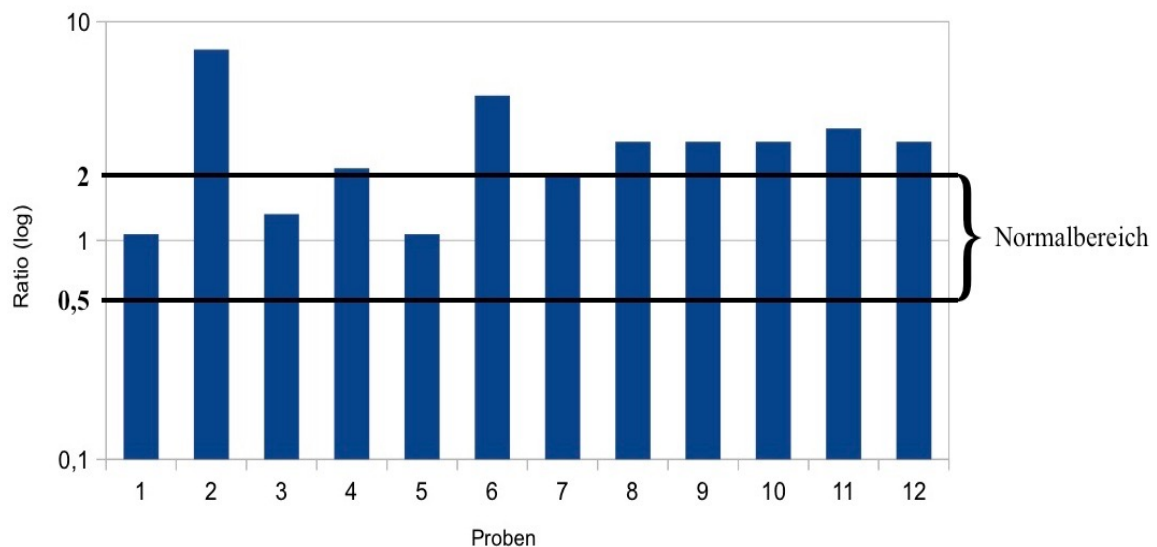


Diagramm 3: relative FLI1-Genexpressionen in der IPMN

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

#### 4.2.1.4. Statistische Auswertung der FLI1-Expressionen

Die statistische Evaluierung der Daten mittels one sample t-test ergab ein hoch signifikant stärker exprimiertes FLI1 sowohl im SPN- als auch im IPMN-Tumorgewebe verglichen zu dessen Expression im Normalgewebe ( $p < 0,0001$  bzw.  $p=0,0006$ ). Für das PDAC konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression im Tumor- und Normalgewebe nachgewiesen werden ( $p=0,078$ ).

Zudem ist FLI1 in der SPN signifikant höher exprimiert als in der IPMN oder im PDAC.

Eine Zusammenfassung der FLI1-Expressionen gibt Diagramm 4.

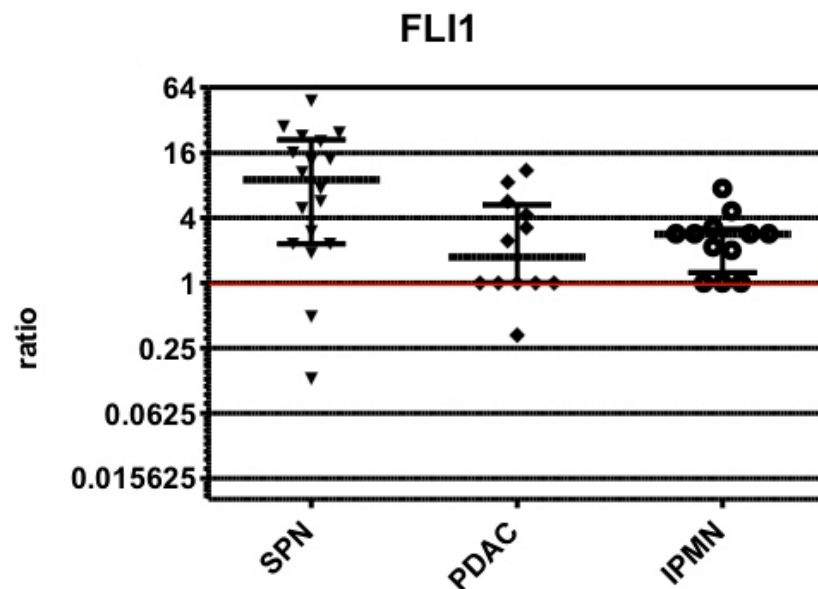


Diagramm 4: FLI1-Expressionen in der SPN, PDAC und IPMN  
Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Tumorentitäten dargestellt.  
Die mediane Expression ist durch die mittlere Linie, der Interquartilsabstand mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem dukalen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)



#### 4.2.2. DKK1

Nr.	SPN	PDAC	IPMN
1	8,0	34,3	undet.
2	0,12	14,93	undet.
3	0,41	32,0	undet.
4	2,46	19,7	55,72
5	78,8	9,19	90,51
6	6,96	6,96	97,01
7	0,13	3,48	undet.
8	39,4	19,7	0,93
9	1,99	1,32	39,4
10	3,03	6,96	25,99
11	5,28	25,99	21,11
12	1,32	1,52	undet.
13	2,58		
14	3,03		
15	1,15		
16	6,5		
17	0,62		
18	0,33		

Tab. 5: Genexpressionen von DKK1 im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1).  
Farbig hinterlegt sind sowohl die Über- (rot) als auch Unterexpressionen (grün) der einzelnen Gene bezogen auf die jeweiligen Proben. Die übrigen Werte befinden sich im Normbereich.

#### 4.2.2.1. SPN

56% der SPN-Proben (10 der 18) wiesen eine DKK1-Expression im überexprimierten Bereich auf (2,46 – 78,8-fach). Weiterhin wurde bei vier Proben eine verminderte DKK1-Expression von 0,12 bis 0,41 (Nr. 2, 3, 7, 18) gemessen, die übrigen 4 DKK1-Fälle (Nr. 9, 12, 15, 17) befanden sich mit Werten von 0,62 bis 1,99 im Bereich des Referenzgewebes. Für DKK1 variierten die Expressionen in den verschiedenen Tumورproben in einem Bereich von über 3 Größenordnungen, wobei Nr. 2 mit einem Wert von 0,12 die niedrigste Expression und Nr. 5 mit 78,8 die stärkste nachgewiesene Expression zeigte.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von DKK1 sind in folgendem Diagramm aufgeführt:

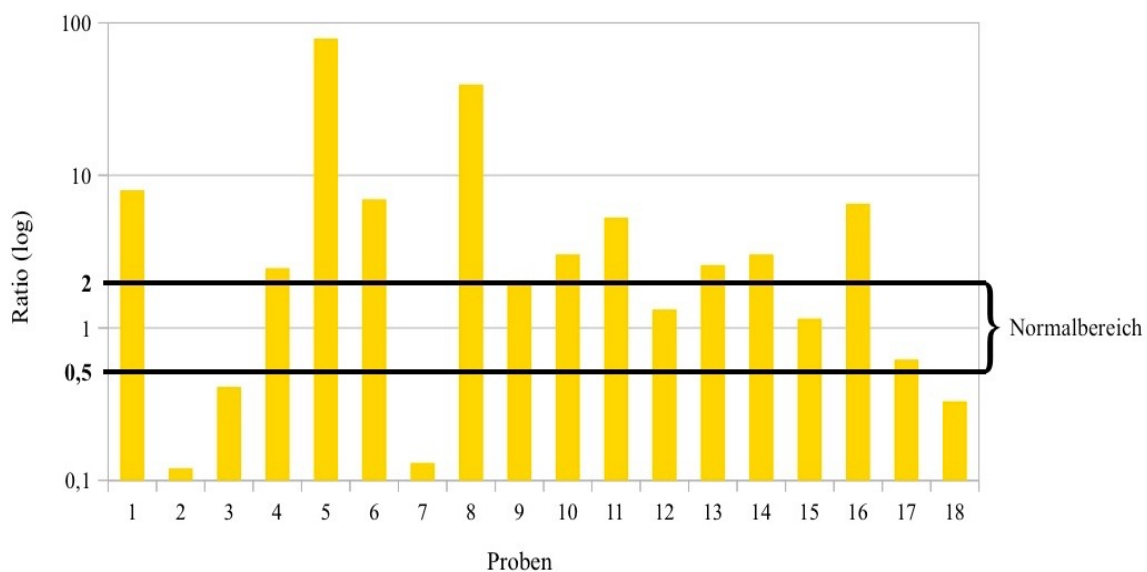


Diagramm 5: relative DKK1-Expression in der SPN

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.2.2. PDAC

Mit 83 % zeichnete sich DKK1 in den PDAC in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (10 von 12 Proben) durch eine mRNA-Überexpression aus und wies dabei Werte zwischen 3,48 und 34,3 auf. Nur Nr. 9 und 12 lagen im Bereich des Normalgewebes (1,32 und 1,52). Somit variierten die Expression der DKK1-mRNA zwischen den einzelnen Tumorseiten in einem Bereich von nur einer Größenordnung. Nr. 1 zeigte dabei mit einem Wert von 34,3 die stärkste Expression und Nr. 9 war die Probe mit dem niedrigsten nachzuweisenden Wert.

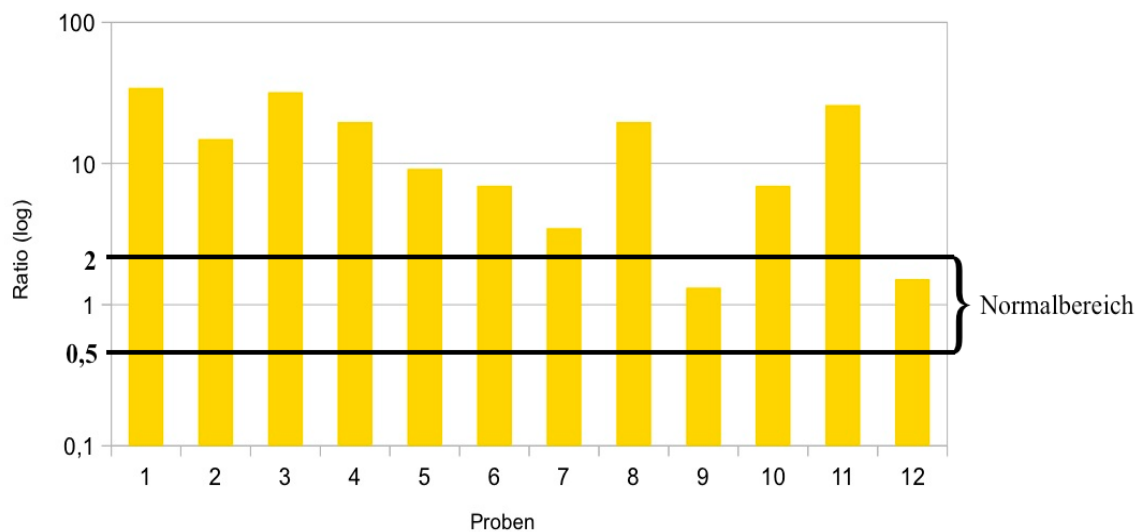


Diagramm 6: relative DKK1-Genexpressionen im PDAC

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.2.3. IPMN

6 der insgesamt 12 untersuchten DKK1-Proben wiesen eine deutliche mRNA-Überexpression auf (21,11- bis 97,01-fach). Nur eine Probe (Nr. 8) befand sich mit einem Wert von 0,93 im Bereich des Normalgewebes. 5 Proben wiesen Werte unterhalb der detektierbaren Grenze auf und konnten somit für die Auswertung der Ergebnisse nicht verwendet werden.

Die Expression der DKK1-mRNA variierte insgesamt in einem Bereich von 2 Größenordnungen. Nr. 6 zeigte mit einem Wert von 97,01 die höchste Expression, während

sich Probe Nr. 8 mit einem Wert von 0,93 deutlich darunter im Normalbereich befand (siehe Diagramm 7).

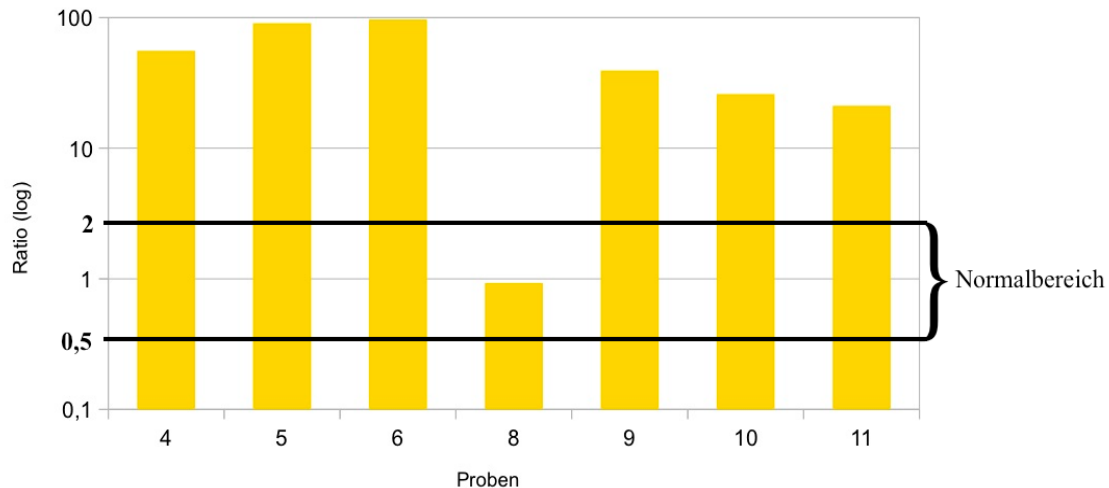


Diagramm 7: relative DKK1-Genexpressionen in der IPMN

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.2.4. Statistische Auswertung der DKK1-Expressionen

Aufgrund der sehr geringen Expression der DKK1-RNA im Pankreas-Normalgewebe als Standard ergaben auch geringe Abweichungen in den Tumorentitäten teilweise sehr hohe Ratios. Allerdings war absolut betrachtet die Expression von DKK1 auch in diesen Fällen noch niedrig. Eine statistische Evaluierung der Ratios erscheint daher nicht aussagekräftig. Dennoch scheint die DKK1-Expression in jeder der drei Tumorentitäten verglichen zum Pankreas-Normalgewebe erhöht. So wiesen 56% der SPN-Proben (10 von 18), 83 % des PDAC (10 von 12) und 50% der IPMN (6 von 12) eine Überexpression der DKK1-RNA auf.

#### 4.2.3. INPP5D

Nr.	SPN	PDAC	IPMN
1	1,69	5,66	9,85
2	0,11	1,52	undet.
3	15,1	3,25	9,19
4	7,4	25,99	5,28
5	14,1	0,38	4,59
6	3,6	0,76	8,57
7	0,37	1,32	0,87
8	5,3	1,32	4,0
9	1,26	1,15	5,66
10	0,4	4,0	4,0
11	2,46	9,85	6,5
12	0,18	1,74	6,96
13	2,06		
14	1,74		
15	1,07		
16	1,07		
17	6,06		
18	0,02		

Tab. 6: Genexpressionen von INPP5D im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1).  
Farbig hinterlegt sind sowohl die Über- (rot) als auch Unterexpressionen (grün) der einzelnen Gene bezogen auf die jeweiligen Proben. Die übrigen Werte befinden sich im Normbereich.

#### 4.2.3.1. SPN

Es konnte eine 2,06 – 15,1-fache INPP5D-Überexpression für 8 der 18 Proben (44%) beobachtet werden, 5 Proben wiesen eine 0,02 – 0,4-fach verminderte Expression auf. Die restlichen 5 INPP5D-Werte befanden sich im Normalbereich (1,07 – 1,74).

Die Expression der INPP5D-mRNA variierte dabei zwischen den einzelnen Tumorproben in einem Bereich von nur 2 Größenordnungen. Nr. 3 zeigte mit einem Wert von 15,1 die höchste mRNA-Expression, während sich Probe Nr. 18 mit einem Wert von 0,02 eine deutlich reduzierte Expression zeigte (siehe Diagramm 8).

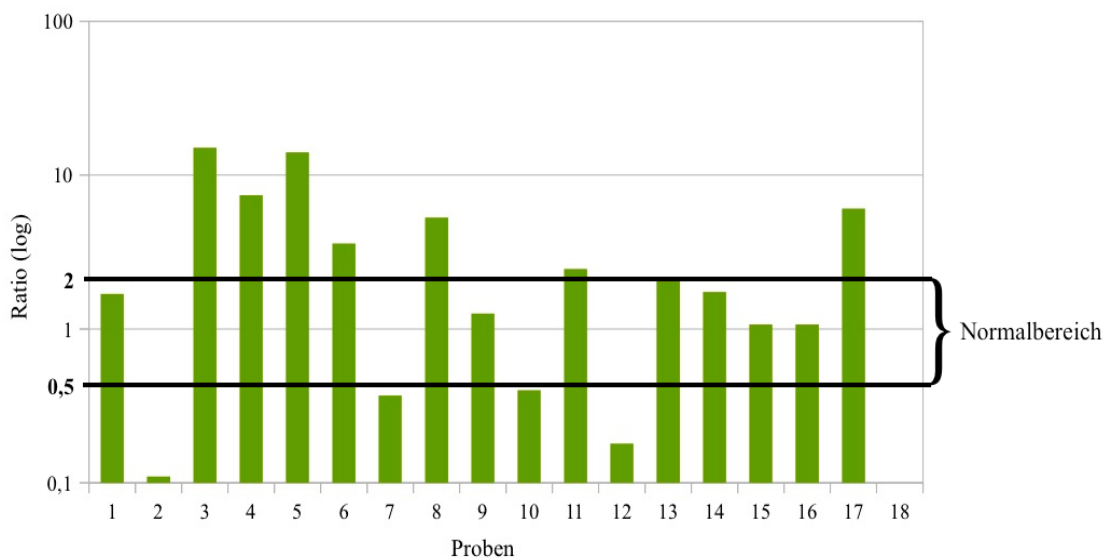


Diagramm 8: relative INPP5D-Genexpressionen in der SPN

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.3.2. PDAC

Mit Werten zwischen 3,25 und 25,99 wiesen 5 der 12 INPP5D-Proben (42%) eine erhöhte mRNA-Expression auf. Eine verminderte Expression zeigte sich ausschließlich bei Nr. 5 (0,38). Die meisten der Tumorproben wiesen eine INPP5D-Expression auf, welche sich im Bereich des Normalgewebes befand (50%).

Die Expression der mRNA variierte dabei zwischen den einzelnen PDAC-Proben für INPP5D

nur in einem Bereich von einer Größenordnung. Wie in Diagramm 9 dargestellt, zeigte Nr. 4 die höchste mRNA-Expression (25,99), während sie in Probe Nr. 5 mit 0,38 den niedrigsten Wert annahm.

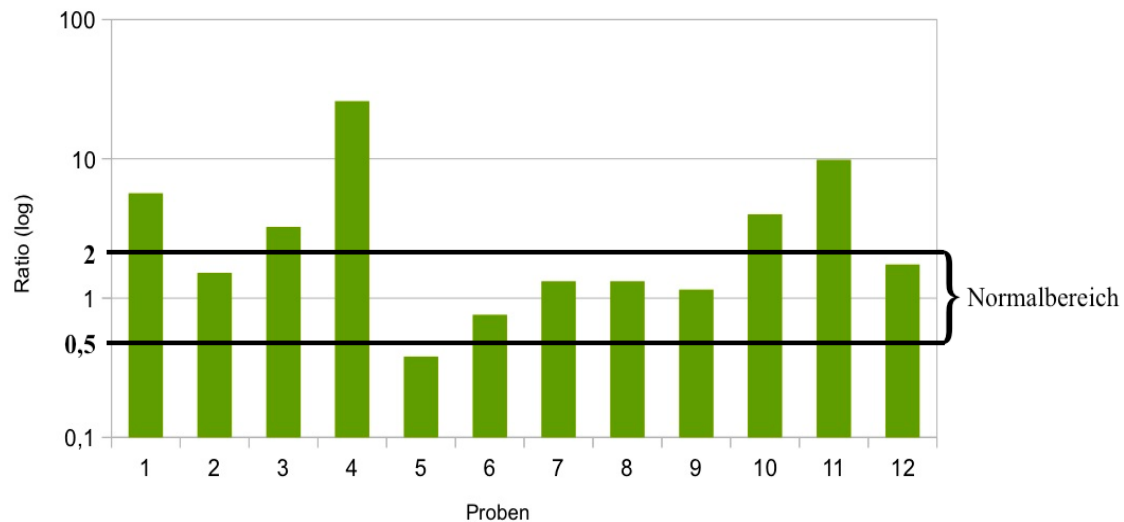


Diagramm 9: relative INPP5D-Genexpressionen im PDAC

Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.3.3. IPMN

Mit 10 von 12 untersuchten IPMN-Tumoren lagen mit 83% beinahe alle Werte im überexprimierten Bereich. Die Werte reichten dabei von 4,0 (Nr. 10) bis zu 9,85 (Nr. 1). Nr. 7 befand sich mit einem Wert von 0,87 als einzige Probe im Bereich des Referenzgewebes. Nr. 2 befand sich unterhalb der detektierbaren Grenze.

Die Expression der INPP5D mRNA variierte dabei zwischen den verschiedenen Tumorproben in einem Bereich von einer Größenordnung. Nr. 1 zeigte mit einem Wert von 9,85 die stärkste Expression, während Nr. 7 die Probe mit dem geringsten Wert war (0,87).

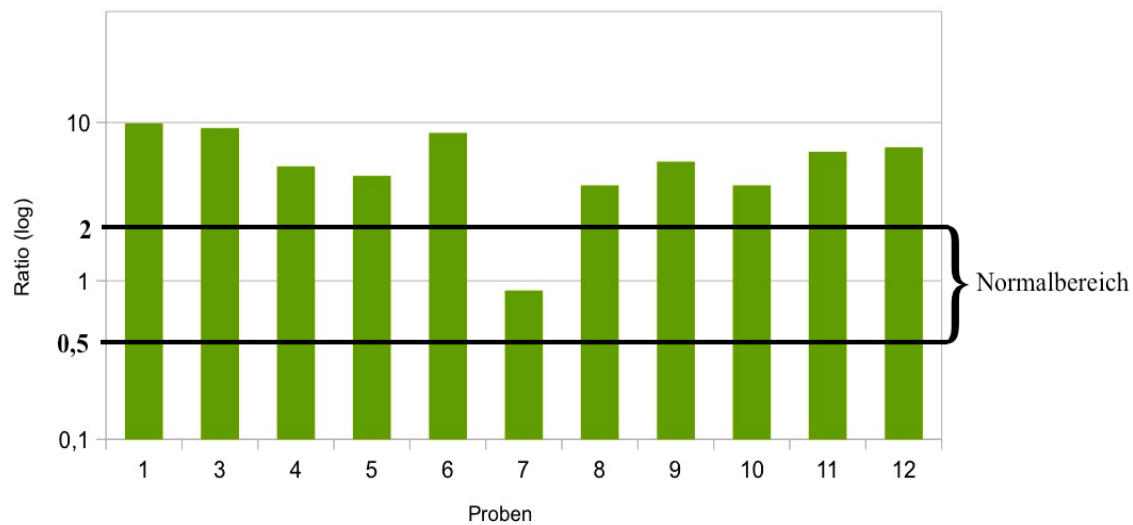


Diagramm 10: relative INPP5D-Genexpressionen in der IPMN  
 Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.3.4. Statistische Auswertung der INPP5D-Expressionen

Durch die statistische Evaluierung der Daten konnte ein hochsignifikant stärker exprimiertes INPP5D im IPMN-Tumorgewebe verglichen zum Pankreas-Normalgewebe nachgewiesen werden. ( $p < 0,0001$ ).

Im SPN-Tumorgewebe ergab sich in der statistischen Auswertung keine signifikant höhere oder verminderte INPP5D-Expression verglichen zum Pankreas-Normalgewebe ( $p = 0,47$ ).

Auch für das PDAC konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression im Tumor- und Normalgewebe eruiert werden. Mit einem Wert von  $p = 0,06$  zeigte sich jedoch eine gewisse Tendenz zur Überexpression von INPP5D in dieser Tumorentität.

Eine Zusammenfassung der INPP5D-Expressionen zeigt das folgende Diagramm:



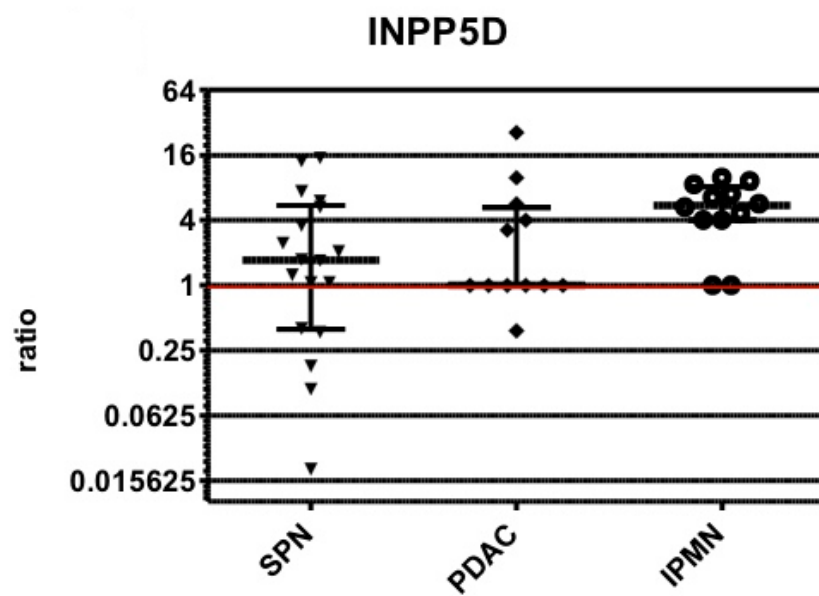


Diagramm 11: INPP5D-Expressionen in der SPN, PDAC und IPMN  
 Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Tumorentitäten dargestellt.  
 Die mediane Expression ist durch die mittlere Linie, der Interquartilsabstand mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

#### 4.2.4. BCL9

Nr.	SPN	PDAC	IPMN
1	0,93	3,73	1,0
2	1,23	2,64	9,19
3	0,93	1,07	0,93
4	0,87		2,0
5	3,73	0,23	0,47
6	1,62	2,83	1,23
7	2,83	2,64	0,33
8	0,76	0,66	1,41
9	0,23	0,76	0,71
10	0,54	1,23	0,76
11	0,31	1,87	1,41
12	0,38	0,57	1,52
13			
14	1,0		
15	1,07		
16	0,44		
17	2,14		
18	0,14		

Tab. 7: Genexpressionen von BCL9 im SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe (dessen Expression = 1).  
Farbig hinterlegt sind sowohl die Über- (rot) als auch Unterexpressionen (grün) der einzelnen Gene bezogen auf die jeweiligen Proben. Die übrigen Werte befinden sich im Normbereich.

#### 4.2.4.1. SPN

Die Mehrzahl der BCL9-Proben (9 von 17) lagen mit Werten von 0,54 – 1,62 im Bereich der Expression des Normalgewebes. Weiterhin zeigten 5 der Proben (Nr. 9, 11, 12, 16, 18) mit Werten von 0,14 – 0,44 eine reduzierte Expression. Die Minderheit (Nr. 5, 7, 17) wies mit Werten von 2,14 – 3,73 eine Überexpression auf.

Für BCL9 variierten die Expressionen in den verschiedenen Tumورproben in einem Bereich von nur einer Größenordnung. Dabei wies Nr. 5 mit einem Wert von 3,73 die stärkste Expression auf und Nr. 18 war die Probe mit dem niedrigsten nachgewiesenen Wert (0,14).

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von BCL9 in der SPN sind in dem nachfolgenden Diagramm aufgeführt:

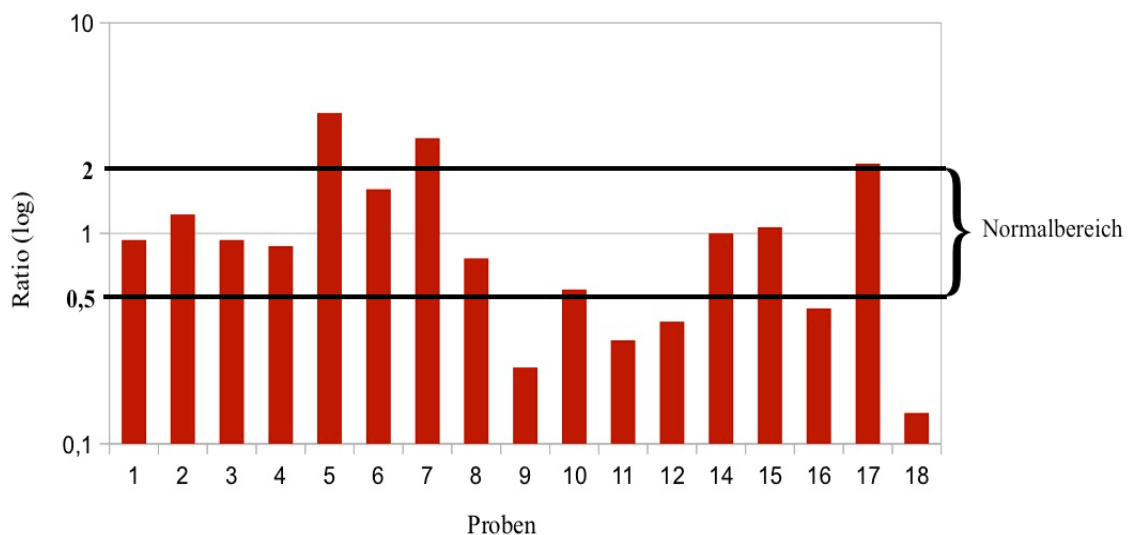


Diagramm 12: relative BCL9-Genexpressionen in der SPN  
Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.4.2. PDAC

Auch bei den 11 untersuchten PDAC-Tumورproben lag die Mehrzahl der BCL9-Expressionen mit Werten von 0,57 bis 1,87 im Bereich des Normalgewebes. 4 Proben (Nr. 1, 2, 6, 7) wiesen eine 2,64 – 3,73-fache BCL9-Überexpression auf. Nr. 5 zeigte als einzige Probe eine

reduzierte Expression (0,23).

Für BCL9 variierten die Expressionen in den verschiedenen Tumورproben in einem Bereich von einer Größenordnung. Nr. 1 zeigte mit einem Wert von 3,73 die stärkste Expression, während Nr. 5 die Probe mit dem niedrigsten nachgewiesenen Wert war (0,23).

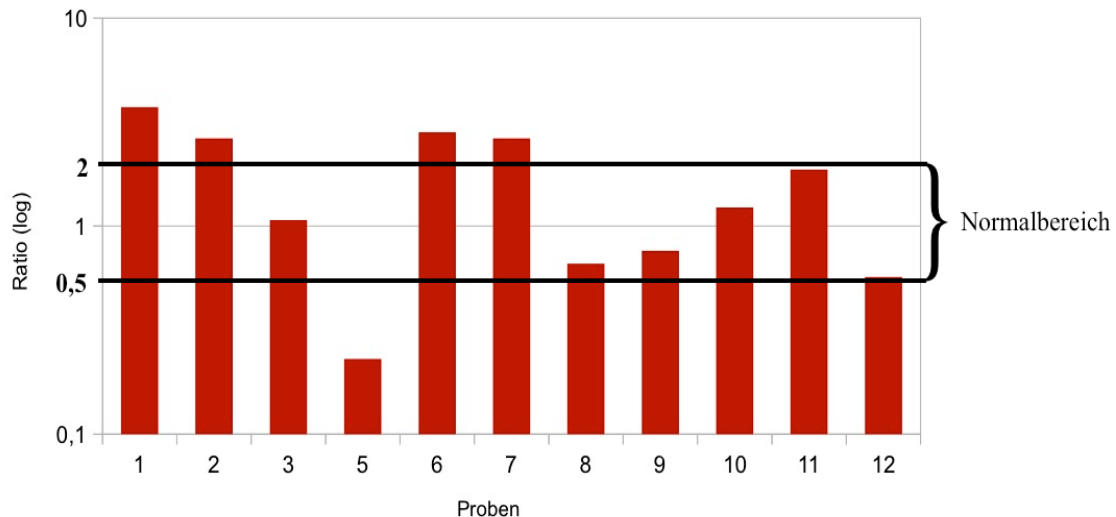


Diagramm 13: relative BCL9-Genexpressionen im PDAC  
Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.4.3. IPMN

Auch in der IPMN lag die Mehrzahl der untersuchten BCL9-Proben (9 von 12) im Expressionsbereich des Normalgewebes. Nr. 5 und 7 zeigten mit Werten von 0,47 bzw. 0,33 eine verringerte Expression verglichen mit der des Referenzgewebes, allein Nr. 2 wies eine 9,19-fache Überexpression auf.

Somit variierte die Expression der BCL9-mRNA zwischen den einzelnen IPMN-Tumورproben in einem Bereich von nur einer Größenordnung. Nr. 7 zeigte mit einem Wert von 0,33 die niedrigste Expression, während sie in Probe 2 mit 9,19 den höchsten Wert annahm (siehe Diagramm 14).

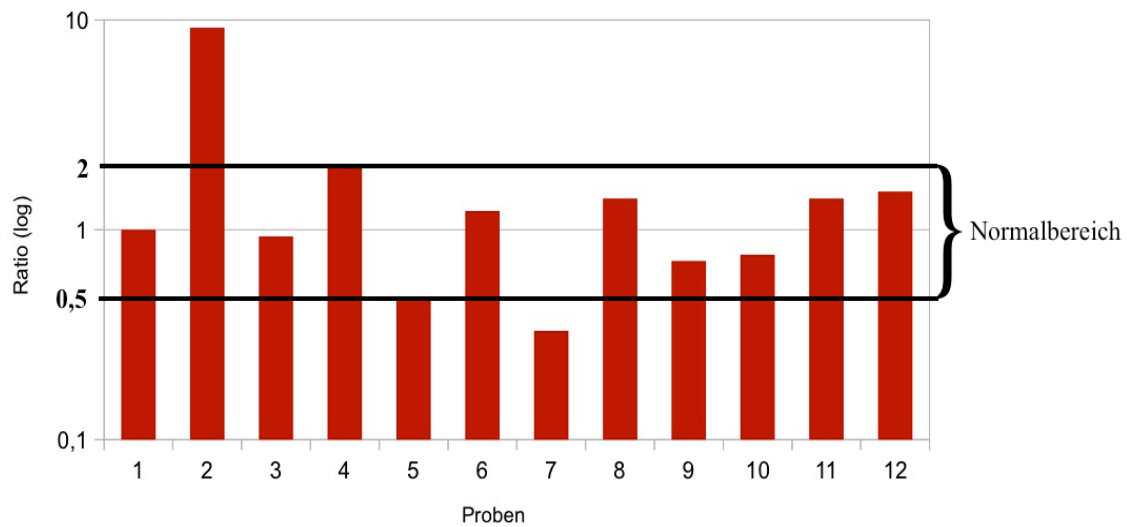


Diagramm 14: relative BCL9-Genexpressionen in der IPMN  
 Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Proben dargestellt

#### 4.2.4.4. Statistische Auswertung der BCL9-Expressionen

Für BCL9 konnte in der statistischen Evaluierung kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression der drei untersuchten Tumorentitäten und dem Pankreasnormalgewebe nachgewiesen werden.

Eine Zusammenfassung der BCL9-Expressionen zeigt das folgende Diagramm:

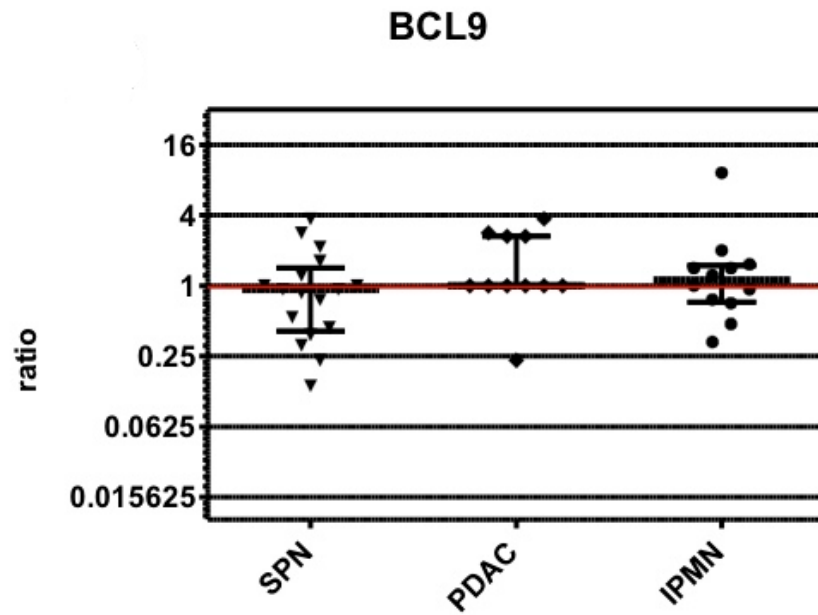


Diagramm 15: BCL9-Expressionen in der SPN, PDAC und IPMN  
 Die Abszisse gibt die Ratio der einzelnen Proben aufgetragen auf einer logarithmischen Skala an, auf der Ordinate sind die jeweiligen Tumorentitäten dargestellt.  
 Die mediane Expression ist durch die mittlere Linie, der Interquartilsabstand mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

### **4.3. Vergleich der Expressionsmuster in den verschiedenen Tumorentitäten**

Um die Expression von jedem der 4 Gene (FLI1, DKK1, INPP5D und BCL9) innerhalb der 3 untersuchten Tumorentitäten (SPN, PDAC und IPMN) vergleichen zu können, erfolgte eine statistische Auswertung der Daten mittels Zweistichproben-t-Test (engl.: two sample t-test).

Eine statistische Evaluierung von DKK1 war aufgrund der zu geringen Expression der DKK1-RNA im Pankreas-Normalgewebe nicht aussagekräftig.

Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.

#### **4.3.1. SPN vs. PDAC**

In der statistischen Evaluierung ergab sich ein signifikanter Unterschied in der FLI1-Expression zwischen dem SPN- und PDAC-Tumorgewebe ( $p = 0,015$ ).

Für INPP5D und BCL9 ergab der Vergleich von SPN und PDAC keine signifikanten Unterschiede.

#### **4.3.2. SPN vs. IPMN**

Die Expression der INPP5D-mRNA war in der IPMN signifikant höher als in der SPN ( $p < 0,03$ ). Zudem ergab sich ein signifikant höher exprimiertes FLI1 in der SPN verglichen mit dessen Expression in IPMN-Tumoren.

#### **4.3.3. PDAC vs. IPMN**

Der Vergleich PDAC vs. IPMN ergab keinen signifikanten Unterschied in der Expression der untersuchten Gene.

## 4.4. Korrelation der Genexpressionen innerhalb einer Tumorentität

### 4.4.1. SPN

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Gene untereinander sind für die SPN in folgender Tabelle aufgeführt:

	FLI1	DKK1	INPP5D
DKK1	$r = 0,69$ ( $p = 0,0014$ )		
INPP5D	$r = 0,88$ ( $p < 0,0001$ )	$r = 0,55$ ( $p = 0,0186$ )	
BCL9	$r = 0,45$ ( $p = 0,07$ )	$r = 0,12$ ( $p = 0,64$ )	$r = 0,54$ ( $p = 0,0246$ )

Tab. 8: Korrelation zwischen 2 Genen in der SPN mit dem entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$ . Werte mit einer starken positiven Korrelation ( $r > 0,8$ ) sind rot hinterlegt, mäßig starke Werte ( $r > 0,6$ ) orange und schwache positive Korrelationen ( $r > 0,5$ ) gelb.

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem dukalen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

Es ließ sich mit  $r = 0,88$  eine starke positive Korrelation zwischen FLI1 und INPP5D ( $p < 0,001$ ) nachweisen. Zudem zeigten die beiden Gene FLI1/DKK1 eine mäßig starke Korrelation  $r = 0,69$  auf ( $p = 0,0014$ ). Eine schwach positive Korrelation wiesen DKK1/INPP5D mit  $r = 0,55$  ( $p = 0,0186$ ) und INPP5D/BCL9 mit  $r = 0,54$  ( $p = 0,0246$ ) auf. Kein statistischer Zusammenhang ließ sich für die Expression der Gene FLI1/BCL9 sowie DKK1/BCL9 eruieren.

Die Korrelationen der Genexpressionen der einzelnen Gene untereinander sind für die SPN in folgendem Diagramm zusammengefasst:



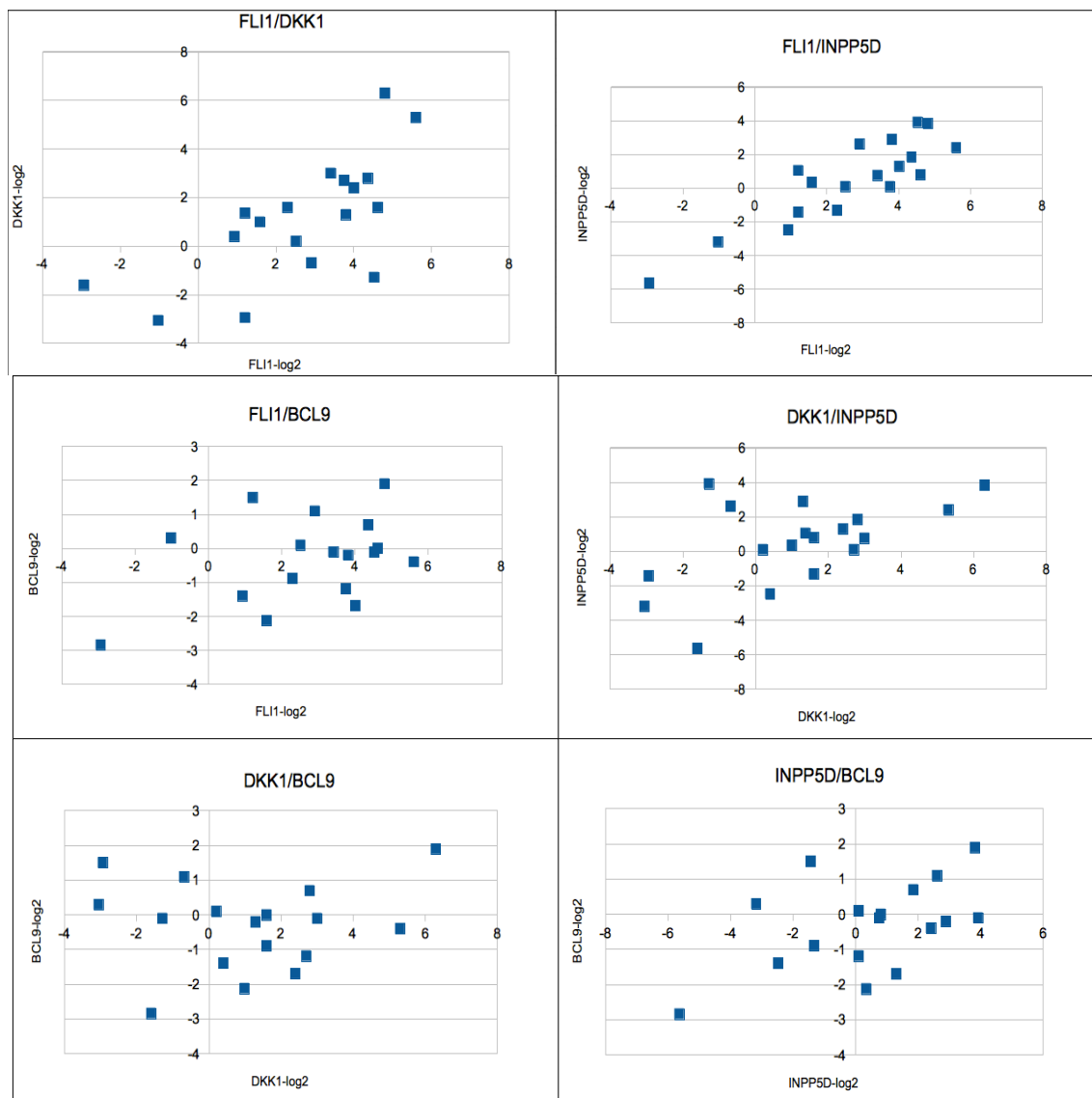


Diagramm 16: graphische Darstellung der Korrelation zwischen zwei Genen in der SPN (logarithmische Werte)

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem dukталen Adenokarzinom des Pankreas und der Intradukталen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

#### 4.4.2. PDAC

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der 4 Gene sind für das PDAC in folgender Tabelle aufgezeigt.

	FLI1	DKK1	INPP5D
DKK1	r = 0,41 (p = 0,11)		
INPP5D	r = 0,97 (p < 0,0001)	r = 0,48 (p = 0,09)	
BCL9	r = 0,58 (p = 0,15)	r = 0,3 (p = 0,71)	r = 0,48 (p = 0,38)

Tab. 9: Korrelation zwischen 2 Genen im PDAC mit den entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizienten r. Werte mit einer starken positiven Korrelation ( $r > 0,8$ ) sind rot hinterlegt, schwache positive Korrelationen ( $0,6 > r > 0,5$ ) gelb.

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

Auch im PDAC wiesen als einzige Gene FLI1 und INPP5D eine starke positive Korrelation auf ( $r = 0,97$ ). Bis auf FLI1/BCL9, welche mit  $r = 0,58$  ( $p = 0,15$ ) eine schwache Korrelation zeigten, ließ sich zwischen den übrigen Genexpressionen kein statistischer Zusammenhang nachweisen (siehe auch Diagramm 17).

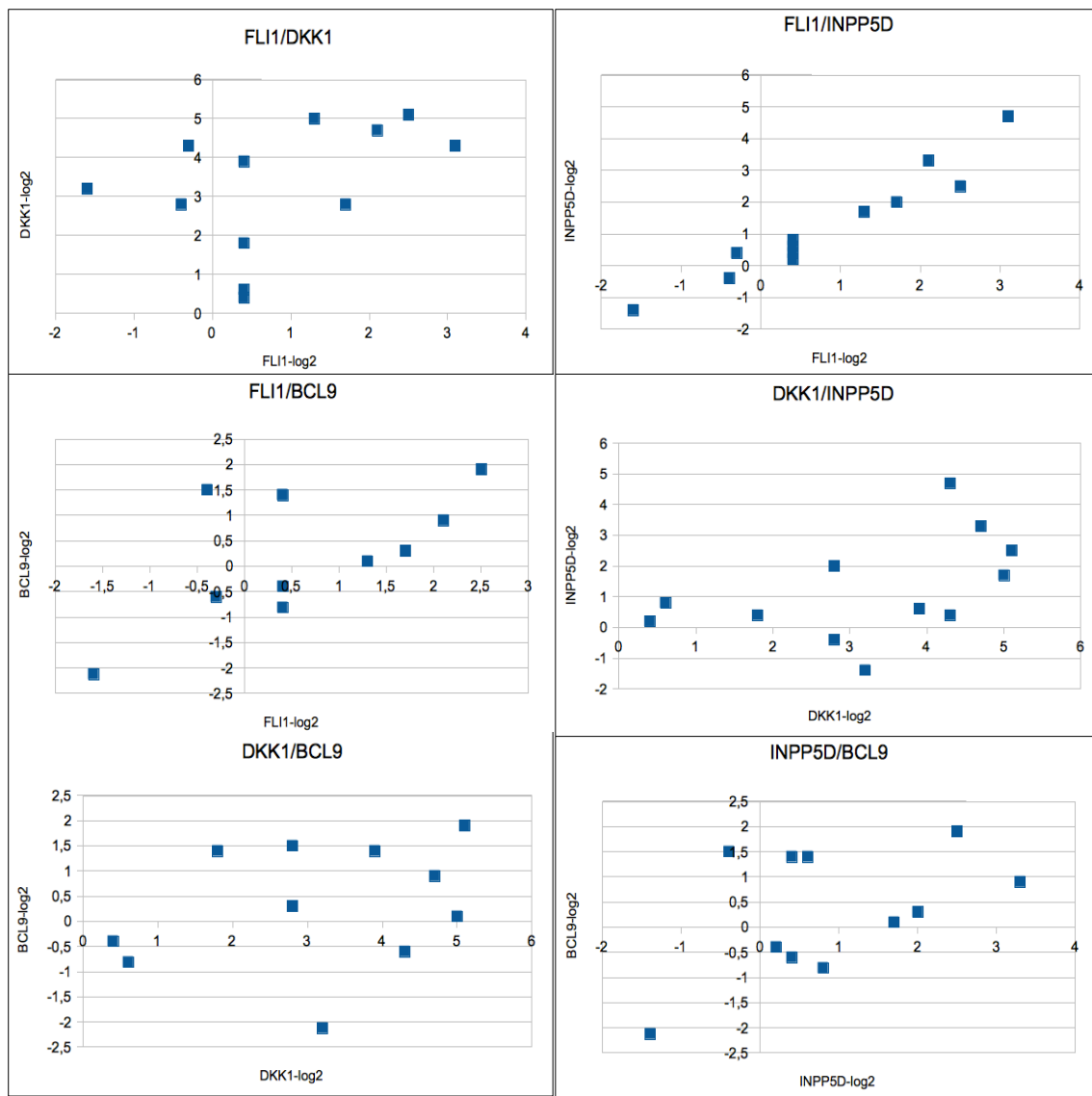


Diagramm 17: graphische Darstellung der Korrelation zwischen zwei Genen im PDAC (logarithmische Werte)

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem dukталen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

#### 4.4.3. IPMN

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse der Expression von FLI1, INPP5D und BCL9 in der IPMN sind in Tabelle 10 dargestellt. Eine statistische Evaluierung von DKK1 war aufgrund der zu geringen Expression der DKK1-RNA im Pankreas-Normalgewebe nicht aussagekräftig.

	FLI1	INPP5D
INPP5D	$r = -0,41$ ( $p = 0,18$ )	
BCL9	$r = 0,60$ ( $p = 0,04$ )	$r = -0,23$ ( $p = 0,47$ )

Tab. 10: Korrelation zwischen 2 Genen in der IPMN mit den entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizienten  $r$ . Der Wert mit einer schwachen positiven Korrelation ist gelb hinterlegt

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

Mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,6$  zeigen als einzige Gene in der IPMN FLI1 und BCL9 eine schwache positive Korrelation in deren Expression. Für FLI1/INPP5D und INPP5D/BCL9 ergab sich kein statistischer Zusammenhang (siehe auch Diagramm 18).

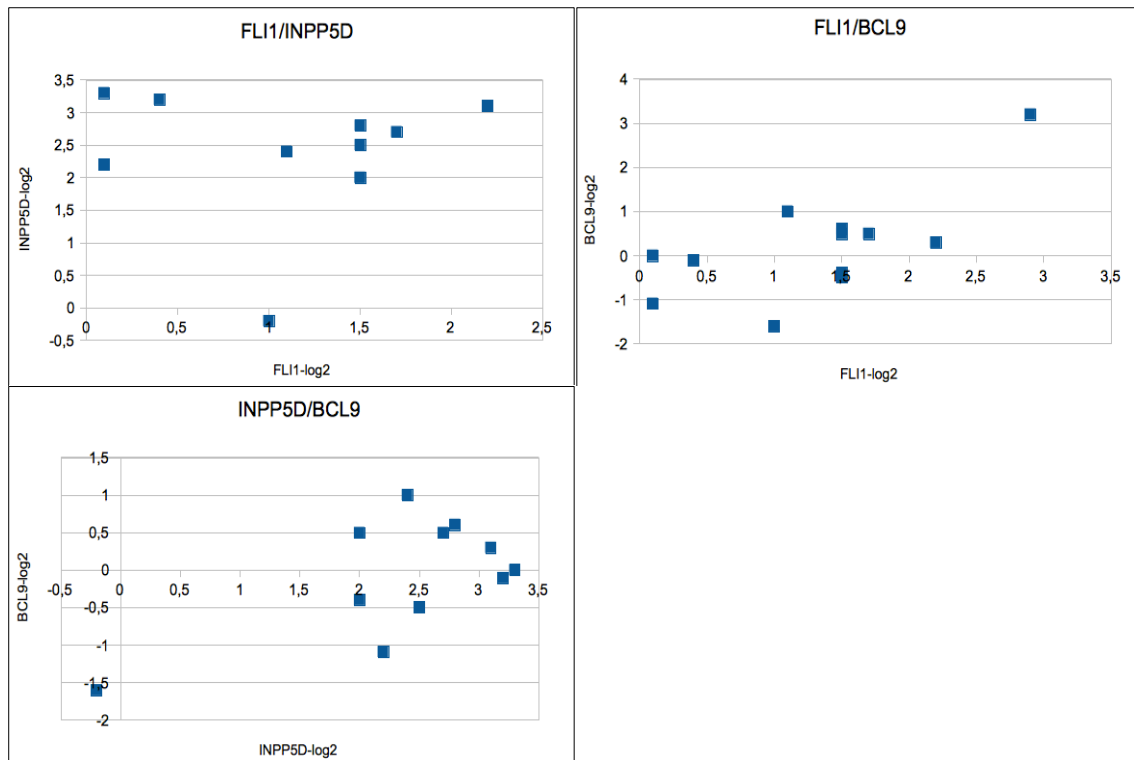


Diagramm 18: graphische Darstellung der Korrelation zwischen zwei Genen in der IPMN (logarithmische Werte)

(Die Ergebnisse der Expression von FLI1 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn L. Domanowsky erstellt und von ihm in der Arbeit "Expressionsmuster von FLI-1, IGFBP3, TOPK und BCL9L in der solid pseudopapillären Pankreasneoplasie, dem duktaalen Adenokarzinom des Pankreas und der Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasie des Pankreas im Vergleich zu Normalgewebe des Pankreas " verwendet.)

## 5. Diskussion

Solid pseudopapilläre Neoplasien des Pankreas sind seltene Tumoren, welche trotz der Aktivierung des onkogenen Wnt-Signalweges und einer daraus resultierenden Überexprimierung des Zellzyklus-assoziierten Proteins Cyclin D1 (70-100% der Fälle) ein erstaunlich benignes Verhalten zeigen (4). Über 90% der SPNs weisen dabei eine Mutation des  $\beta$ -Catenin-Gens CTNNB1 auf Chromosom 3 auf, welche in einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges resultiert (7). Weitere molekulare Mechanismen sind jedoch unbekannt. Auch PDAC zeigen, als häufigste pankreatische Neoplasie, eine Wnt/ $\beta$ -Catenin-Aktivierung, die sich in der Mehrheit der Fälle in einer aberranten zytoplasmatischen (65%) oder nukleären (13%)  $\beta$ -Catenin-Expression äußert (26). Mutationen kommen praktisch nicht vor. Im Gegenteil zur SPN sind PDAC jedoch sehr aggressive Tumoren mit einer infausten Prognose (9).

IPMN hingegen weisen ein deutlich weniger malignes Verhalten als PDAC auf, sind jedoch aggressivere Tumoren als die SPN. Ihre Prognose hängt von dem größten vorkommenden Dysplasiegrad der Zellen ab, bzw. der Tatsache, ob sich bereits ein invasives Adenokarzinom gebildet hat (9). Die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in der IPMN ist jedoch umstritten und weniger gut erforscht (18). Abnormale nukleäre  $\beta$ -Catenin Lokalisationen in 39% dieser Tumoren (v.a. höhergradige Neoplasien wie das Carcinoma in situ oder invasives Karzinom) deuten aber darauf hin, dass auch ein Teil der IPMNs Abweichungen im Wnt-Signalweg mit einer daraus resultierenden veränderten Expression von nachgeschalteten Proteinen (c-Myc 78%, Cyclin D1 67%) aufweisen (28).

Um die molekulare Basis dieser drei Neoplasien angesichts des aktivierten Wnt-Signalweges genauer zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der Gene FLI1 sowie DKK1 und INPP5D (SHIP1) als durch FLI1 regulierte Gene und BCL9 als Bestandteil des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges untersucht. Hierfür wurden mit Hilfe einer quantitativen TaqMan-PCR 18 SPN-, 12 PDAC- und 12 IPMN-Tumorproben verschiedener Patienten untersucht, um so das jeweilige Expressionsmuster der vier Gene auf RNA-Ebene im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe zu bestimmen.

## 5.1. FLI1-RNA-Expressionsanalyse

Der Transkriptionsfaktor FLI1 wird in 63 % der SPN auf Proteinebene aberrant exprimiert und weist eine positive Korrelation zu der Expression von Cyclin D1, einem primären Ziel des Wnt-Signalweges, auf (4). Jedoch resultiert diese Cyclin D1-Überexpression nicht, wie in anderen Neoplasien üblich, in einer erhöhten Proliferationsrate, sondern zeigt in der SPN keinen, bzw. nur einen geringen Wachstumseffekt (4). In der vorliegenden Arbeit konnte eine FLI1-Überexpression auf RNA-Ebene bei sogar 83% der SPN-Tumorproben nachgewiesen werden und untermauert somit die bekannte Rolle des Transkriptionsfaktors FLI1 nochmals auf einer weiteren Expressionsebene.

Eine noch immer signifikante FLI1-Überexpression vergleichen zum Pankreas-Normalgewebe, jedoch mit 66,7% der Fälle deutlich geringeren Rate als in der low-grade malignen SPN, wies die IPMN, als Neoplasie mit mittlerer Malignität auf. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg konnte jedoch bis jetzt noch nicht aufgezeigt werden.

Nur in der Mehrzahl der PDAC-Tumorproben (50%) lag FLI1 im Bereich des Normalgewebes, lediglich 41,7% wiesen eine Überexpression auf. Somit konnte für das sehr aggressive PDAC kein signifikanter Unterschied zwischen der FLI1-Expression im Tumor- und Normalgewebe nachgewiesen werden.

Aufgrund der prozentual geringer werden Überexpression mit zunehmender Malignität der untersuchten pankreatischen Neoplasien, könnte FLI1 hier einen möglichen Einfluss auf die Abschwächung onkogener Signalwege haben. Auf andere Weise bekannt ist eine FLI1-Interaktion beispielsweise durch das in Ewing-Sarkomen vorkommende EWS/FLI1-Fusionsprotein, welches als aberranter Transkriptionsfaktor durch die Aktivierung bzw. Unterdrückung spezifischer Zielgene (z.B. DKK1, s.u.) jedoch onkogene Funktion erhält (32). Eine diesem Prinzip ähnliche chromosomale Veränderung bzw. Translokation von FLI1 könnte möglicherweise auch einen inhibierenden Effekt auf onkogene Signalwege ausüben. Dies würde die steigende nukleäre Über- bzw. Fehlexpression von FLI1 mit geringer werdender Malignität erklären.

## 5.2. DKK1-RNA-Expressionsanalyse

Durch Bindung an den Wnt-Co-Rezeptor LRP 5/6 inhibieren DKK1-Proteine als extrazelluläres Signalmolekül eine Komplexbildung mit dem Wnt-Frizzled-Rezeptor und inaktivieren so den Wnt-Signalweg (34). Folglich wird intrazelluläres  $\beta$ -Catenin durch Aktivierung seines Abbaukomplexes degradiert, so seine nukleäre Translokation verhindert und die Transkription potenziell onkogener Zielgene, wie Cyclin D1, durch den TCF unterdrückt (21). Neben dieser Funktion als potenter Inhibitor des Wnt-Signalweges stellt DKK1 zusätzlich ein TCF-Zielgen dar, weshalb es zugleich ein negatives Feedback auf den Wnt-Signalweg ausübt (34). Dieser DKK1-Rückkopplungs-Mechanismus hätte eine mögliche Erklärung für das niedrig maligne Verhalten der SPN-Tumore darstellen können, da sein onkogenes Potenzial so nicht im vollen Ausmaß zum Tragen kommen würde (6). Jedoch wurde eine solche gesteigerte DKK1-Expression in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt. Sowohl in der SPN als auch in den anderen beiden Tumorentitäten PDAC und IPMN konnten nur sehr geringe Expressionen der DKK1-RNA nachgewiesen werden. Obwohl die DKK1-Expression in jeder der drei Tumorentitäten zunächst erhöht schien, ist eine statistische Evaluierung der Ratios aufgrund der sehr geringen Expression der DKK1-RNA im Pankreas-Normalgewebe als Standard nicht aussagekräftig, da schon geringe Abweichungen in den Tumorentitäten im Vergleich zum Normalgewebe zum Teil sehr hohe Ratios ergaben. Die Hypothese einer Beteiligung von DKK1 an dem niedrig malignen Verhalten der SPN gilt somit vorerst als widerlegt. Eine mäßig starke positive Korrelation zwischen FLI1 und DKK1 ( $r = 0,88$ ) wurde für die SPN jedoch bestätigt.

Es gibt Untersuchungen an murinen PDAC-Geweben, welche die Vermutung nahe legen, dass invasive Tumoren von Zellen ohne DKK1-Expression entstehen (27). Zudem wurden Hypothesen aufgestellt, nach denen eine verminderte DKK1-Expression im Ewing-Sarkom durch die inhibierende Wirkung des EWS/FLI1-Fusionsproteins sowohl auf die basale als auch die durch  $\beta$ -Catenin induzierte Transaktivierung des DKK1-Promoters entsteht und so zu dem aggressiven und hoch malignen Verhalten dieser Tumoren führt (32). Eine ähnliche Rolle hätte DKK1 in PDAC spielen können, jedoch konnte auch diese Hypothese vorerst nicht belegt werden.

Zudem zeigt die Widerlegung dieser aufgestellten Hypothesen den Unterschied in der



Onkogenese der pankreatischen Neoplasien zu anderen Krebsarten (z.B. Multiples Myelom, Hepatoblastom oder Prostatakarzinom), in deren Entstehung DKK1 eine entscheidende Rolle spielt (34). Eine DKK1-Überexprimierung entsteht dort aufgrund von Mutationen im  $\beta$ -Catenin oder Proteinen seines Abbaukomplexes (z.B. Axin oder APC) (34).

### **5.3. INPP5D-RNA-Expressionsanalyse**

Die Phosphatase und Inhibitor von Cyclin D1 INPP5D spielt als Inaktivator des anti-apoptotischen und potenziell onkogenen PI3K/AKT-Signalweges eine entscheidende Rolle in der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen (Leukämie, Lymphome), wobei seine Proteinexpression in diesen Neoplasien reduziert bzw. mutiert ist (36). Zudem wird INPP5D in osteoklastischen Vorläuferzellen vermindert exprimiert und durch FLI1 in einer negativen Feedback-Schleife reguliert (29). In F-MuL-Virus verursachten Erythroleukämien resultiert diese verminderte INPP5D-Expression durch Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und daraus folgender Überexpression des Transkriptionsfaktors FLI1 in einer Epo-induzierten Proliferation transformierter Zellen bei gleichzeitiger Suppression ihrer Differenzierung (29). Diese für Erythroleukämien mögliche Hypothese hätte für SPNs, besonders da eine erhöhte FLI1-Expression bereits nachgewiesen werden konnte, ebenso erfüllt werden können.

Cyclin D1 führt, als primäres Ziel des Wnt-Signalweges, normalerweise zusammen mit seinen Cyclin-dependent Kinasen zu einer Phosphorylierung des Retinoblastoma (Rb)-Proteins, welches wiederum in einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F resultiert (4). Der Zellzyklus wird somit, durch den Übergang von der G1- in die S-Phase vorangetrieben. Die Phosphorylierung des Rb-Proteins durch Cyclin D1 scheint, trotz einer Überexpression in 70 – 100% der Fälle, in der SPN jedoch inaktiviert, da in keiner dieser Tumoren phosphoryliertes Rb zu finden ist (4). Obwohl p21 und p27 als Cyclin D1-Inhibitoren hier bereits eine wichtige Rolle zuteil wird (in 86% und 100% der SPN exprimiert) (4), hätte eine Überexpression von INPP5D als weiteren Cyclin D1-Inhibitor eine ähnliche bzw. additive Rolle spielen können. Jedoch konnte in dieser Arbeit keine signifikant gesteigerte oder verminderte INPP5D-Expression verglichen zum Pankreas-Normalgewebe nachgewiesen und

somit die Hypothese, eine INPP5D-Überexpression könne mit der geringen Proliferationsrate der SPN-Tumore in Zusammenhang stehen, vorerst nicht bestätigt werden. Zudem zeigte sich für die SPN eine starke positive Korrelation zwischen FLI1 und INPP5D, welche ebenfalls im Gegensatz zu der beschriebenen negativen Feedback-Schleife in Erythroleukämien steht. Gewebespezifische Modifikationen, vor allem in der Funktion des Transkriptionsfaktors FLI1, könnten eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied sein.

Für PDAC konnte bereits in 68% (auf Proteinebene) bis 82% (mRNA) der Tumoren ein aberrant oder gesteigert exprimiertes Cyclin D1 nachgewiesen werden (42), welches aktiviert eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation und somit Tumorwachstum spielt und daher mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (43). Auf der anderen Seite führt in murinen Pankreaskarzinomen eine verminderte INPP5D-Expression über die Expansion von MDSC und Unterdrückung der tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu einer Aktivierung des proliferations-induzierenden PI3K/AKT-Signalweges (36). Jedoch wies INPP5D als Cyclin D1-Inhibitor weder eine gesteigerte noch eine verminderte Expression im PDAC auf. Es zeigte sich aber auch in dieser Tumorentität eine starke positive Korrelation zwischen der INPP5D- und FLI1-Expression.

In der IPMN, als weniger aggressivem Pankreastumor, konnte in der statistischen Evaluierung der Daten als einzige der drei untersuchten Neoplasien ein hochsignifikant stärker exprimiertes INPP5D verglichen zum Pankreas-Normalgewebe nachgewiesen werden.

Obwohl Cyclin D1 in der IPMN weniger exprimiert zu sein scheint als im PDAC (44), gibt es nur sehr wenige Daten hierzu. Im Gegensatz zur SPN kann eine INPP5D-Überexpression in der IPMN daher ein Grund für das niedrig maligne Verhalten dieser Tumore darstellen und zeigt erneut den prinzipiellen Unterschied zwischen SPN und den dukталen pankreatischen Neoplasien auf. Zudem konnte in der IPMN als einzige von den drei untersuchten Neoplasien kein statistischer Zusammenhang zwischen der FLI1- und INPP5D-Expression gezeigt werden, sodass INPP5D in dieser Entität unabhängig von FLI1 das maligne Verhalten modifizieren könnte.

## 5.4. BCL9-RNA-Expressionsanalyse

Eine vermehrte Expression von BCL9, als Ko-Aktivator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, konnte bereits in verschiedenen Tumorzellen (z.B. B-ALL, kolorektale Karzinome, Mammakarzinome), im Gegensatz zum dazugehörigen Normalgewebe, nachgewiesen werden (22). Obwohl der genaue Funktionsmechanismus noch nicht eruiert werden konnte, scheint BCL9 über eine direkte Bindung an  $\beta$ -Catenin dessen Transkriptionsaktivität zu steigern, was durch eine Hochregulierung der Wnt-Zielgene in einer erhöhten Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierungspotenzial der Tumorzellen resultiert (22). So wird BCL9 in Zellen des kolorektalen Karzinoms, dessen Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert ist, als Wnt-induziertes Gen überexprimiert (37). Zudem wird angenommen, dass BCL9 Teil einer positiven Feedback-Schleife auf den Wnt-Signalweg ist und so als mögliches Onkogen unabhängig von Wnt-Liganden zu einer Progression der kolorektalen Karzinome führt (37). Ähnlich wie es in diesen Tumoren bereits beschrieben wurde, hätte eine gesteigerte BCL9-Expression auch in der PDAC-Entstehung eine Rolle spielen können, vor allem in Hinblick auf ihr aggressives Tumorwachstum und die schlechte klinische Prognose. Ebenso wäre eine verminderte BCL9-Expression eine mögliche Erklärung für das niedrig maligne Verhalten der SPN-Tumore oder für die IPMN-Entstehung gewesen. In dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der BCL9-Expression in den drei untersuchten Tumorentitäten und dem Pankreasnormalgewebe nachgewiesen werden. Somit gilt eine Beteiligung von BCL9 in der SPN-, PDAC- und IPMN-Tumorgenese als vorerst widerlegt.

## 6. Zusammenfassung

Die Tumorgenese der SPN, ebenso wie der Grund ihres benignen bzw. low-grade malignen Verhaltens als seltene Tumoren mit einer erstaunlich guten Prognose, ist noch nicht geklärt. Obwohl eine Mutation des  $\beta$ -Catenin-Gens CTNNB1 (83-90% der SPNs) über eine Aktivierung des potenziell onkogenen Wnt-Signalweges in 70-100% der SPNs zu einer Überexpression des Zellzyklus-assoziierten Proteins Cyclin D1 führt, resultiert dies nicht, wie in vielen anderen Neoplasien üblich, in einer erhöhten Proliferationsrate. In der SPN zeigt eine solche Cyclin D1-Überexpression keinen, bzw. nur einen geringen Wachstumseffekt.

PDAC hingegen, als häufigste pankreatische Neoplasie, sind sehr aggressive Tumoren mit einer infausten Prognose. Eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges resultiert hier vor allem aus einer aberranten zytoplasmatischen (65%) oder nukleären (13%)  $\beta$ -Catenin-Expression.

IPMN dagegen weisen ein deutlich weniger malignes Verhalten als PDAC auf, sind jedoch aggressivere Tumoren als die SPN, wobei ihre Prognose von dem größten vorkommenden Dysplasiegrad der Zellen abhängt. Obwohl die Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges in der IPMN umstrittener und weniger gut erforscht ist, deuten abnormale nukleäre  $\beta$ -Catenin Lokalisationen v.a. in höhergradigen Neoplasien darauf hin, dass auch ein Teil der IPMNs Abweichungen im Wnt-Signalweg aufweisen.

Um die molekulare Basis dieser drei Neoplasien angesichts des aktivierten Wnt-Signalweges noch etwas genauer zu beleuchten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung der Gene FLI1 sowie DKK1 und INPP5D (SHIP1) als durch FLI1 regulierte Gene und BCL9 als Bestandteil des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges untersucht. Hierfür wurden mit Hilfe einer quantitativen TaqMan-PCR 18 SPN-, 12 PDAC- und 12 IPMN-Tumorproben verschiedener Patienten untersucht, um so das jeweilige Expressionsmuster der vier Gene auf RNA-Ebene im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe zu bestimmen.

Für den Transkriptionsfaktor **FLI1** konnte in der SPN bereits eine Überexpression auf Proteinebene (63%) sowie positive Korrelation zu der Expression von Cyclin D1 nachgewiesen werden. Auf RNA-Ebene zeigten in dieser Arbeit sogar 83% der SPN-

Tumorproben eine FLI1-Überexpression und untermauern somit die bekannte Rolle von FLI1 in der SPN-Tumorgenese.

Im Gegensatz zur SPN konnte für die IPMN bzw. das PDAC bisher noch kein möglicher Zusammenhang zum Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aufgezeigt werden, obwohl für die IPMN-Tumore ebenfalls ein signifikant stärker exprimiertes FLI1 verglichen zum Normalgewebe nachgewiesen wurde (66,7%). Nur für das aggressive PDAC konnte kein signifikanter Unterschied eruiert werden, hier lagen mit 50% die Mehrzahl der Tumorproben im Bereich des Normalgewebes.

Das signifikant höher exprimierte FLI1 in den benignen bzw. low-grade malignen SPN-Tumoren verglichen zur IPMN mit mittlerer Malignität oder dem sehr aggressiven PDAC, zeigt eine prozentual geringer werdende Überexpression mit zunehmender Malignität der untersuchten pankreatischen Neoplasien. So könnte eine nukleäre Über- bzw. Fehlexpression von FLI1 einen möglichen Einfluss auf die Abschwächung onkogener Signalwege haben. Ähnlich, wie dies bereits vom onkogenen Transkriptionsfaktor EWS/FLI1 in Ewing-Sarkomen bekannt ist, könnte eine FLI1-Translokation bzw. chromosomale Veränderung ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf solche onkogenen Signalwege ausüben.

Im Gegensatz zu FLI1 konnten für **DKK1**, ein den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivierendes extrazelluläres Signalmolekül, sowie für **BCL9**, ein Ko-Aktivator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges, in keiner der untersuchten Tumorentitäten signifikante Unterschiede zwischen der Expression im Tumor- und Normalgewebe nachgewiesen werden. So mussten die anfangs aufgestellten Hypothesen, DKK1 oder BCL9 könnten für das niedrig-maligne Verhalten der SPN oder den aggressiven Tumorwachstum der PDAC mitverantwortlich sein, vorerst verworfen werden.

**INPP5D** (SHIP1) reguliert als Phosphatase sowie Inhibitor von Cyclin D1 u.a. den PI3K/AKT-Signalweg und spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung maligner hämatologischer Erkrankungen (z.B. Leukämie, Lymphome). Zudem ist hier eine gegenseitige Regulierung von FLI1 und INPP5D in einer negativen Feedback-Schleife möglich. Jedoch wurde in dieser

Arbeit weder eine signifikant gesteigerte oder verminderte INPP5D-Expression verglichen zum Pankreas-Normalgewebe nachgewiesen noch die Hypothese der negativen Feedback-Schleife bestätigt, da FLI1 und INPP5D vielmehr eine starke positive Korrelation aufwiesen. Gewebespezifische Modifikationen, vor allem in der Funktion des Transkriptionsfaktors FLI1, könnten eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied sein.

Auch für das PDAC ist ein aberrant oder erhöht exprimiertes Cyclin D1 in 68-82% der Fälle bekannt, welches aufgrund eines erhöhten Tumorwachstums mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist. Jedoch wies INPP5D als Cyclin D1-Inhibitor weder eine gesteigerte noch eine verminderte Expression im PDAC auf, zeigte aber auch in dieser Tumorentität eine starke positive Korrelation zur FLI1-Expression.

Einzig in der weniger aggressiven IPMN konnte ein hochsignifikant stärker exprimiertes INPP5D verglichen zum Pankreas-Normalgewebe nachgewiesen werden. Auch Cyclin D1 scheint in der IPMN weniger exprimiert zu sein als im PDAC, jedoch gibt es nur sehr wenige Daten hierzu. Folglich kann eine erhöhte INPP5D-Expression, möglicherweise durch Cyclin D1-Inhibition, eine mögliche Erklärung für das niedrig maligne Verhalten der IPMN-Tumore darstellen.

Die anfangs aufgestellte Hypothese einer Beteiligung der Gene DKK1 und BCL9 sowohl an der SPN- als auch an der PDAC- und IPMN-Tumorgenese musste aufgrund der hier erhobenen Daten vorerst verworfen werden. Jedoch scheint FLI1 eine entscheidende Rolle in der SPN-Tumorgenese zu spielen. Zudem sind sowohl FLI1 als auch INPP5D in der IPMN signifikant überexprimiert, allerdings unabhängig voneinander. Die Frage, über welchen intrazellulären Signalweg FLI1 und INPP5D diese Rolle ausüben, konnte noch nicht geklärt werden. Auch der molekulargenetische Grund für das niedrig maligne Verhalten der SPN bzw. intermediär-maligne Verhalten der IPMN bleibt weiterhin ein nur zum Teil gelöstes Rätsel und wirft noch immer eine Vielzahl von Fragen auf.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Klöppel G, Hruban RH, Klimstra DS, Maitra A, Morohoshi T, Notohara K, et al. Solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. World Health Organization Classification of Tumours of the digestive system. Lyon 2010; pp. 327-30.
2. Munding J, Sunitsch S, Belyaev O, Liffers S-T, Uhl W, Tannapfel A. Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: a case series, comparison of histo1. Munding J, Sunitsch S, Belyaev O, Liffers S-T, Uhl W, Tannapfel A. Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: a case series, comparison of histopathological and clinical data. Z Gastroenterol. 2011.
3. Kosmahl M, Seada LS, Jänig U. Solid – pseudopapillary tumor of the pancreas : its origin revisited. Am J Surg Pathol. 2000; 473–80.
4. Tiemann K, Heitling U, Kosmahl M, Klöppel G. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas show an interruption of the Wnt-signaling pathway and express gene products of 11q. Mod Pathol. 2007; 20(9): 955–60.
5. Kosmahl M, Peters K, Anlauf M, Sipos B. Solid-pseudopapilläre Neoplasien. Pathologe. 2005;4–8.
6. Philipp J. Expressionsmuster von FLI1, DKK1 und SHIP-1 in der solid pseudopapillären Neoplasie der Pankreas. 2013; 1–41.
7. Tanaka Y, Kato K, Notohara K, Hojo H, Ijiri R, Miyake T, et al. Frequent beta-catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudopapillary neoplasm. Cancer Res. 2001; 61(23):8401–4.
8. Hruban RH, Fukushima N. Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. Mod Pathol. 2007; 61–70.
9. Tumours of the Exocrine Pancreas WHO histological classification of tumours of the exocrine pancreas. 2010.
10. Crnogorac-Jurcevic T, Chelala C, Barry S, Harada T, Bhakta V, Lattimore S, et al. Molecular analysis of precursor lesions in familial pancreatic cancer. PLoS One. 2013; 8(1):e54830.
11. Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. Mod Pathol. 2003; 16(5):403–10.
12. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. Mod Pathol. 2000; 13(9):962–72.

13. Iacobuzio-Donahue C a, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, et al. Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *Am J Pathol.* 2003; 162(4):1151–62.
14. Zorde Khvalevsky E, Gabai R, Rachmut IH, Horwitz E, Brunschwig Z, Orbach A, et al. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(51):20723–8.
15. Sinn B V, Striefler JK, Rudl M a, Lehmann A, Bahra M, Denkert C, et al. KRAS Mutations in Codon 12 or 13 Are Associated With Worse Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas.* 2014; 43(4):578–83.
16. Okabayashi T, Shima Y, Kosaki T, Sumiyoshi T, Kozuki A, Iiyama T, et al. Invasive carcinoma derived from branch duct-type IPMN may be a more aggressive neoplasm than that derived from main duct-type IPMN. *Oncol Lett.* 2013;5(6):1819–25.
17. Sohn T a., Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Fukushima N, Campbell K a., et al. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Ann Surg.* 2004; 239(6):788–99.
18. Hirabayashi K, Zamboni G, Ito H, Ogawa M, Kawaguchi Y, Yamashita T, et al. Synchronous pancreatic solid pseudopapillary neoplasm and intraductal papillary mucinous neoplasm. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(21):3358–63.
19. Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, Yoshida S, Hatori T, Yamamoto M, et al. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep.* 2011; 1:161.
20. Amato E, Molin MD, Mafficini A, Yu J, Malleo G, Rusev B, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes dissects the molecular profiles of intraductal papillary neoplasms of the pancreas. *J Pathol.* 2014; 233(3):217-27.
21. Clevers H. Review Wnt /  $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell.* 2006; 469–80.
22. Takada K, Zhu D, Bird GH, Sukhdeo K, Zhao J, Lemieux M, et al. Targeted Disruption of the BCL9/ $\beta$ -catenin Complex Inhibits Oncogenic Wnt Signaling. *Sci Transl Med.* 2012; 4(148).
23. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006; 281(32):22429–33.
24. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(5):387–98.



25. Arensman MD, Kovochich a N, Kulikauskas RM, Lay a R, Yang P-T, Li X, et al. WNT7B mediates autocrine Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. 2014; 33(7):899–908.
26. Pasca di Magliano M, Biankin A V, Heiser PW, Cano D a, Gutierrez PJ a, Deramaudt T, et al. Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One*. 2007; 2(11):e1155.
27. Zhang Y, Morris JP, Yan W, Schofield HK, Gurney A, Simeone DM, et al. Canonical Wnt Signaling Is Required for Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer Res*. 2013; 73(15):4909–22.
28. Chetty R, Serra S, Salahshor S, Alsaad K, Shih W, Blaszyk H, et al. Expression of Wnt-signaling pathway proteins in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a tissue microarray analysis. *Hum Pathol*. Elsevier; 2006; 37(2):212–7.
29. Lakhanpal GK, Vecchiarelli-Federico LM, Li Y-J, Cui J-W, Bailey ML, Spaner DE, et al. The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood*. 2010; 116(3):428–36.
30. FLI1 (Friend leukemia virus integration 1) [Internet]. [cited 2012 Jun 26]. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FLI1ID79ch11q24.html>.
31. Tiemann K, Kosmahl M, Ohlendorf J, Krams M, Klöppel G. Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are associated with FLI-1 expression, but not with EWS/FLI-1 translocation. *Mod Pathol*. 2006; 19(11):1409–13.
32. Navarro D, Agra N, Gonza M. The EWS / FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes b-catenin / TCF-mediated transcription. 2010; 31(3):394–401.
33. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*. 2006; 25(57):7469–81.
34. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, et al. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*. 2004; 23(52):8520–6.
35. INPP5D Gene - GeneCards | Protein | Antibody [Internet]. [cited 2012 Jun 22]. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl.gene=INPP5D>.
36. Pilon-Thomas S, Nelson N, Vohra N, Jerald M, Pendleton L, Szekeres K, et al. Murine pancreatic adenocarcinoma dampens SHIP-1 expression and alters MDSC homeostasis and function. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27729.
37. De la Roche M, Worm J, Bienz M. The function of BCL9 in Wnt/beta-catenin signaling and colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 2008; 8:199.

38. Mani M, Carrasco DE, Zhang Y, Takada K, Gatt ME, Dutta-Simmons J, et al. BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells. *Cancer Res.* 2009; 69(19):7577–86.
39. Sustmann C, Flach H, Ebert H, Eastman Q, Grosschedl R. Cell-type-specific function of BCL9 involves a transcriptional activation domain that synergizes with beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(10):3526–37.
40. Biosystems A. Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System.
41. Jolla L. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. *Science.* 2004; 87–112.
42. Zalatnai A, Molnár J. Review. Molecular background of chemoresistance in pancreatic cancer. *In Vivo.* 2007; 21(2):339–47.
43. Radulovich N, Pham N-A, Strumpf D, Leung L, Xie W, Jurisica I, et al. Differential roles of cyclin D1 and D3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2010; 9:24.
44. Adenocarcinoma D. Sonic Hedgehog Signaling Pathway in Pancreatic Cystic. 2007; 34(3):340–6.

## **8. Abgrenzung der Doktorarbeit von der Diplomarbeit**

In der 2013 vorgelegten Diplomarbeit wurde das Expressionsmuster von FLI1, DKK1 sowie INPP5D in der solid pseudopapillären Neoplasie des Pankreas analysiert. Hierzu wurde eine quantitative Analyse durchgeführt, um die Expressionsmuster dieser drei Gene in 16 SPN-Tumormaterialien im Vergleich zum gesunden Pankreasgewebe beurteilen zu können. Es sollte offene Fragen zur SPN-Tumorgenese, insbesondere zur Fehlregulation des Wnt-Signalweges, nachgegangen werden. Die bereits auf Proteinebene nachgewiesene Überexpression von FLI1 konnte in der Diplomarbeit noch einmal auf RNA-Ebene bestätigt werden, die anfangs aufgestellte Hypothese einer Beteiligung der Gene DKK1 und INPP5D an der SPN-Tumorgenese bestätigte sich jedoch nicht.

Zur Ermittlung einer genauen statistischen Korrelation der vorliegenden Ergebnisse waren jedoch weitere Untersuchungen notwendig, welche in der erweiternden Doktorarbeit durchgeführt wurden. Zudem wurden die Untersuchungen um ein weiteres Gen, nämlich BCL9, ergänzt und neben der SPN zusätzlich das duktales Adenokarzinom sowie die intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie des Pankreas auf die Genexpressionsmuster sowie deren möglicher Zusammenhang mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg untersucht.

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. K. Tiemann spreche ich meinen Dank aus für das Überlassen der interessanten Thematik und ihre Betreuung in der Anfertigung der Arbeit über die Hämatopathologie Hamburg.

Ebenso gilt mein ausdrücklicher Dank Herrn Prof. Klapper, welcher durch die Übernahme der Arbeit als Betreuer die Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möglich gemacht hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Cora Hallas für die intensive Unterstützung und Förderung, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Sie stand mir stets mit wertvollen fachlichen Ratschlägen und hilfreicher Unterstützung auf wissenschaftlichem Gebiet zur Seite.

Bei allen Labor-Mitarbeitern des Instituts für Hämatopathologie Hamburg, insbesondere Dr. Bettina Kah und Dr. Markus Falk, möchte ich mich für die Begleitung in der Durchführung der Experimente und das stets freundliche und hilfsbereite Arbeitsklima bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Klöppel, ehemaliger Direktor des Pathologischen Instituts Kiel, möchte ich für die zur Verfügung gestellten Pankreas-Normalgewebe und SPN-Tumorgewebe danken, welche für die Experimente unerlässlich waren.

Ausdrücklich gilt mein großer Dank meinen Eltern und meinem Lebensgefährten, die mir die Ausbildung ermöglicht und mich bei der Verwirklichung meiner Ziele stets vertrauensvoll unterstützt haben.

## **Zustimmung**

Ich stimme zu, dass diese Doktorarbeit sowohl in elektronischer als auch in gedruckter Form durch den Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein für Studenten, Dozenten, Mitarbeiter und Interessierte ohne Einschränkungen zugänglich gemacht wird.